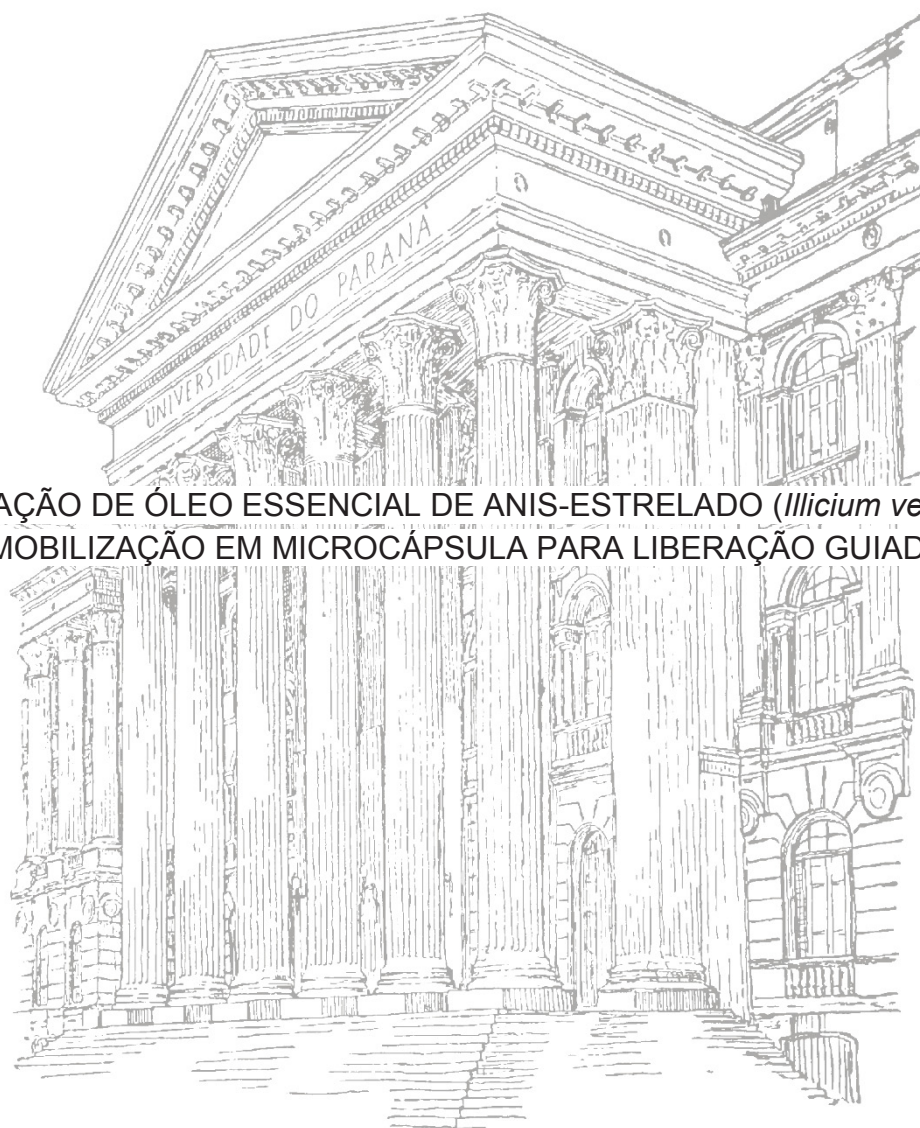


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BÁRBARA GOMES IAREMA DESTRO

EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO (*Illicium verum*) E  
IMOBILIZAÇÃO EM MICROCAPSULA PARA LIBERAÇÃO GUIADA



CURITIBA

2019

BÁRBARA GOMES IAREMA DESTRO

EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO (*Illicium verum*) E  
IMOBILIZAÇÃO EM MICROCÁPSULA PARA LIBERAÇÃO GUIADA

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Alimentos, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, vinculada ao Departamento de Engenharia Química do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Luiz Mathias

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regina Maria Matos Jorge.

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

D477e

Destro, Bárbara Gomes Iarema

Extração de óleo essencial de anis-estrelado (*illicium verum*) e  
imobilização em microcápsula para liberação guiada / Bárbara Gomes Iarema  
Destro. – Curitiba, 2019.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa  
de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2019.

Orientador: Alvaro Luiz Mathias. Coorientador: Regina Maria Matos  
Jorge.

1. Antioxidantes. 2. Extração (Química). 3. Anis-estrelado. 4. Essências e  
óleos essenciais. I. Universidade Federal do Paraná. II. Mathias, Alvaro Luiz.  
III. Jorge, Regina Maria Matos. IV. Título.

CDD: 615.321

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS - 40001016019P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **BARBARA GOMES IAREMA DESTRO** intitulada: **EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO (*Illicium verum*) E IMOBILIZAÇÃO EM MICROCÁPSULA PARA LIBERAÇÃO GUIADA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Junho de 2019.

ALVARO LUIZ MATHIAS  
Presidente da Banca Examinadora

CRISTIANE VIEIRA HELM  
Avaliador Externo (EMBRAPA)

ROSEMARY HOFFMANN RIBANI  
Avaliador Interno (UFPR)

VITOR RENAN DA SILVA  
Avaliador Interno (UFPR)

LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE  
Avaliador Externo (UFPR)



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus e a Nossa Senhora de Schoenstatt, pela inspiração e proteção. Também a minha filha Sara, por ser minha maior motivação para finalizar o doutorado. Agradeço ao meu marido, pais e irmão, pela paciência, força e compreensão nos meus momentos de estresse.

Agradeço também ao meu orientador e à minha coorientadora, Professor Dr. Álvaro Luiz Mathias e Professora Dr.<sup>a</sup> Regina Maria Matos Jorge, respectivamente, que me aceitaram e participaram do desafio de elaborar e cumprir as metas do meu projeto de pesquisa de doutorado em apenas dois anos e meio. Sou extremamente grata aos dois pela confiança, apoio e por suas contribuições ao presente trabalho.

Ao laboratório Emultec, ao Laboratório de Análises em Compostos Bioativos, ao Grupo de Cromatografia e às Técnicas de Microextração (CroMe), ao Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ) e ao Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS), todos da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio técnico durante todo o projeto.

Aos amigos e colegas da pós-graduação, pela troca de conhecimentos e parceria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, pela contribuição à minha formação acadêmica e científica.

Agradeço também a CNPq e a CAPES, pela bolsa concedida.

## RESUMO

Óleo essencial de anis-estrelado chinês (*Illicium verum* Hook) (OE) é composto majoritariamente por trans-anetol (TA), o qual possui propriedades antioxidantes, anticancerígenas e, possivelmente, pode ser utilizado no tratamento de mal de Alzheimer. Sua extração tem sido relatada via hidrodestilação (HD) por até 5h, o que pode onerar o processo e diminuir a qualidade do produto. A administração deste OE pode ser oral, sendo apresentada neste estudo a formulação em microcápsulas de hidrogel. Assim, o presente trabalho teve por finalidade otimizar a extração do OE a partir do fruto desidratado e triturado de anis-estrelado; verificar a qualidade do OE em termos de TA e capacidade antioxidante. Ainda, otimizar a emulsificação e a microencapsulação de OE, bem como estimar *in vitro* as condições de liberação do TA no sistema gastrointestinal humano. O maior rendimento de OE ocorreu para condição HD7 (10,8%, em base seca), usando frutos triturados com granulometria inferior a 425 µm, 16% de massa, 200 mL de água destilada e 3h de extração. Sua produtividade foi de 3,6 g OE/(100g bs.h) e teor de TA de 80,4%. No entanto, a condição de maior pureza de TA (96,6%) no OE (HD1), apresentou rendimento levemente menor (10,2%, em base seca), mas com produtividade muito superior (10,2 g OE/[100g bs.h]) para mesmo volume de água, porém utilizando 8% de massa e apenas 1h de processo. Para a capacidade antioxidante, esta foi independente de TA e a condição HD5 (<425 µm, 16%, 3h, 500 mL, 82,2% TA) obteve melhor resultado para as quatro metodologias aplicadas (compostos fenólicos totais, FRAP, ABTS e DPPH), sugerindo possível efeito sinérgico entre os componentes do OE. Não foi observada correlação entre essas 4 metodologias; a DPPH foi a recomendada para avaliar OE, pois usa solvente mais adequado (metanol) e apresentou ótimo coeficiente de determinação ao modelo estatístico. O OE da HD1 foi usado para a otimização da emulsificação e da microencapsulação. A emulsão mais estável ocorreu para adição de até 2,0% de OE, 0,4% de NaAlg, mínimo de 2% de emulsificante (T80) e agitação próxima a 5.000 rpm por tempo superior a 1,5 min. No entanto, para aplicação da emulsão em microencapsulação, deve-se empregar maiores valores de OE (10,0%) e NaAlg (2,5%). Assim, a condição E6 foi modificada (E6m) pela adição de NaAlg (2,5%). O ponto ótimo para a microencapsulação foi: 10% OE, 2,5% NaAlg, 2,0% T80, 5.000 rpm de agitação por 2 min e gotejada a 15 cm em uma solução salina contendo 2,0% CaCl<sub>2</sub> e um tempo de maturação de 15,5 min. Sua eficiência de encapsulação foi de 96,6%. Análises termogravimétricas revelaram que a emulsificação com aditivo produz matriz com interação entre os componentes e que a microencapsulação protege o OE até 130°C. As microimagens de microscopia invertida revelaram a redução das microcápsulas em função das condições de secagem (25, 42,5 e 60°C/24h e liofilizadas), enquanto que as microimagens de MEV revelaram superfície íntegra para as secas a 25°C/24h, promovendo maior proteção física do TA. A liberação deste foi maior no fluido intestinal simulado, exatamente o melhor ambiente para sua assimilação.

Palavras-chave: Anis-estrelado. Antioxidantes. Emulsificação. Hidrodestilação. Microencapsulação. Óleo essencial. Otimização. Cinética de liberação gastrointestinal.

## ABSTRACT

The star anise (*Illicium verum* Hook) essential oil (EO) is composed mostly of trans-anethole (TA), which has antioxidant, anticancer and possibly can be used in the treatment of Alzheimer disease. Its extraction has been reported via hydrodistillation (HD) for up to 5h, which can burden the process and decrease the quality of the product. The administration of this EO can be oral, being presented in this study the formulation in microcapsules of hydrogel. Thus, the present work purposes the optimizing the extraction of EO from dehydrated and crushed star anise fruit; to verify the quality of EO in terms of TA and the antioxidant capacity. Further, optimize the emulsification and microencapsulation of EO, as well as in vitro estimation of TA release conditions in the human gastrointestinal system. The highest EO yield occurred for HD7 condition (10.8%, dry basis), using crushed fruits with a grain size of less than 425  $\mu\text{m}$ , 16% mass, 200 mL of distilled water and 3h of extraction. Its productivity was 3.6 g EO/(100 g db.h) and TA content of 80.4%. However, the higher TA purity (96.6%) in EO (HD1) presented a slightly lower yield (10.2%, dry basis), but with a much higher yield (10.2 g EO/100g db.h)] for the same volume of water, but using 8% of mass and only 1h of process. For the antioxidant capacity, this was independent of TA and the HD5 condition (<425  $\mu\text{m}$ , 16%, 3h, 500 mL, 82.2% TA) obtained better results for the four applied methodologies (total phenolic compounds, FRAP, ABTS and DPPH), suggesting a possible synergistic effect among the EO components. No correlation was observed between these 4 methodologies; DPPH was the recommended one to evaluate EO, because it uses a more adequate solvent (methanol) and presented a good coefficient of determination to the statistical model. HD1 EO was used for the optimization of emulsification and microencapsulation. The most stable emulsion occurred for addition of up to 2.0% EO, 0.4% NaAlg, a minimum of 2% emulsifier (T80) and stirring at about 5,000 rpm for a time greater than 1.5 min. However, for application of the emulsion in microencapsulation, higher values of EO (10.0%) and NaAlg (2.5%) should be used. Thus, condition E6 was modified (E6m) by addition of NaAlg (2.5%). The optimal point for microencapsulation was: 10% EO, 2.5% NaAlg, 2.0% T80, 5,000 rpm stirring for 2 min and dripped at 15 cm in a saline solution containing 2.0%  $\text{CaCl}_2$  and a maturation time of 15.5 min. Its encapsulation efficiency was 96.6%. Thermogravimetric analyzes revealed that the emulsification with additive produces matrix with interaction between the components and that the microencapsulation protects the EO up to 130°C. The microimaging of inverted microscopy revealed the reduction of microcapsules depending on the drying conditions (25, 42.5 and 60°C/24h and lyophilized), while the microimaging of SEM revealed an intact surface for the droughts at 25°C/24h, promoting greater physical protection of TA. The release of this was greater in the simulated intestinal fluid, exactly the best environment for its assimilation.

Keywords: Star anise. Antioxidants. Emulsification. Hydrodistillation. Microencapsulation. Essential oil. Optimization. Gastrointestinal release kinetics.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FRUTOS FRESCOS (A) E DESIDRATADOS (B) DE ANIS-ESTRELADO.....	20
FIGURA 2 -	ESTRUTURA DO TRANS-ANETOL.....	20
FIGURA 3 -	ESTRUTURA DO D-LIMONENO.....	20
FIGURA 4 -	ESTRUTURA DO ESTRAGOL.....	20
FIGURA 5 -	FRUTOS DAS ESPÉCIES COMESTÍVEL (A) E TÓXICA (B) DE ANIS-ESTRELADO.....	22
FIGURA 6 -	EXEMPLOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	25
FIGURA 7 -	REAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO COM MOLIBDÊNIO, COMPONENTE DO REAGENTE DE FOLIN-CIOCAULTEAU.	26
FIGURA 8 -	REDUÇÃO DO COMPLEXO TPTZ (2,4,6-TRI(2-PIRIDIL)-1,3,5-TRIAZINA) COM $Fe^{3+}$ .....	27
FIGURA 9 -	MECANISMO DE REAÇÃO ENTRE RADICAL ABTS $\bullet$ + E O ANTIOXIDANTE.....	27
FIGURA 10 -	MECANISMOS DE REAÇÃO ENTRE O RADICAL DPPH $\bullet$ E UM ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA TRANSFERÊNCIA DE UM ÁTOMO DE HIDROGÊNIO.....	28
FIGURA 11 -	COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE FLUIDOS INDEPENDENTES DO TEMPO.....	30
FIGURA 12 -	FASES DE MEDIÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL COM ANEL DE DU NOUY.....	31
FIGURA 13 -	ESQUEMATIZAÇÃO DAS FORÇAS ATUANTES NA EMERSÃO DO ANEL DE DU NOUY.....	32
FIGURA 14 -	ESQUEMA DA MICROENCAPSULAÇÃO USANDO SERINGA.....	33
FIGURA 15 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ALGINATO DE SÓDIO.....	33
FIGURA 16 -	DESENHO ESQUEMÁTICO DO MODELO “CAIXA DE OVO” PARA FORMAÇÃO DE GEL DE ALGINATO.....	34
FIGURA 17 -	MORFOLOGIA E MICROESTRUTURA DE MICROCÁPSULAS EM CONDIÇÃO ÓTIMA DE ENCAPSULAÇÃO.....	35

FIGURA 18 -	ETAPAS DE CARACTERIZAÇÃO, EXTRAÇÃO E OTIMIZAÇÕES APLICADAS PARA OBTER ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO MICROENCAPSULADO.....	37
FIGURA 19 -	SISTEMAS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E DA FRAÇÃO LIPÍDICA DO ANIS-ESTRELADO CHINÊS.....	41
FIGURA 20 -	EQUIPAMENTO CROMATOGRÁFICO GC-MS.....	43
FIGURA 21 -	ESQUEMA DA SELEÇÃO DO MATERIAL TRITURADO PARA REMOAGEM E HIDRODESTILAÇÃO.....	44
FIGURA 22 -	MICROENCAPSULAÇÃO DO OE UTILIZANDO SERINGA....	51
FIGURA 23 -	MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV).....	55
FIGURA 24 -	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO DAS MICROESTRUTURAS POR MEV.....	55
FIGURA 25 -	ASPECTO VISUAL INICIAL DA REPLICATA 1 DO pH 1,2 CONTENDO 400 mg DE MICROCÁPSULAS SECAS.....	57
FIGURA 26 -	ASPECTO VISUAL DO ANIS-ESTRELADO CHINÊS COMERCIAL.....	58
FIGURA 27 -	CURVAS DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG) E SUAS DERIVADAS (DTG) PARA O PADRÃO TRANS-ANETOL (TA) E PARA O ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO (OE). .....	60
FIGURA 28 -	ASPECTO VISUAL DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA MOAGEM DE ANIS-ESTRELADO.....	62
FIGURA 29 -	(A) PERFIL MÉDIO DAS FRAÇÕES DE FRUTOS COMERCIAIS SUJEITAS À FRAGMENTAÇÃO (15 s,15 g); (B) FRAÇÕES ACUMULADAS PARA DIFERENTES MASSAS E TEMPOS DE MOAGEM DE ANIS-ESTRELADO COMERCIAL.....	62
FIGURA 30 -	ANÁLISE VISUAL DOS INTERVALOS DE GRANULOMETRIA UTILIZADOS NA HIDRODESTILAÇÃO...	63
FIGURA 31 -	FRAÇÕES RETIDAS PARA DIFERENTES CONDIÇÕES DE MOAGEM.....	64

FIGURA 32 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA MOAGEM DO ANIS-ESTRELADO – DCCR.....	65
FIGURA 33 -	ASPECTO VISUAL DAS FRAÇÕES OLEOSAS EXTRAÍDAS DO ANIS-ESTRELADO.....	67
FIGURA 34 -	CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSA DO OE OBTIDO NAS CONDIÇÕES DE HIDRODISTILAÇÃO UM (HD1) E SETE (HD7).....	70
FIGURA 35 -	CURVA DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (a) E SUA DERIVADA (b) PARA OEs DA HD E PADRÃO TA.....	72
FIGURA 36 -	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO TA PADRÃO E DOS OEs OBTIDOS POR DIFERENTES CONDIÇÕES DE HIDRODESTILAÇÃO.....	74
FIGURA 37 -	CORRELAÇÕES ENTRE A COMPOSIÇÃO DE TA (%) NO OE <i>VERSUS</i> VALORES OBTIDOS NOS TESTES DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE .....	76
FIGURA 38 -	CORRELAÇÕES ENTRE AS RESPOSTAS DOS DIFERENTES TESTES DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE TA E OE.....	79
FIGURA 39 -	MICROGRAFIAS DAS EMULSÕES, COM PRESENÇA OU NÃO DE ALGINATO, OBTIDAS COM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (AUMENTO DE 160x).....	82
	MICROGRAFIAS DAS EMULSÕES, COM PRESENÇA OU NÃO DE ALGINATO, OBTIDAS COM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (AUMENTO DE 160x) (CONTINUAÇÃO).....	83
FIGURA 40 -	EFEITO DA CONDIÇÃO DE EMULSIFICAÇÃO SEM ADIÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO NA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE GOTAS DAS EMULSÕES.....	84
FIGURA 41 -	ESTABILIDADE DAS EMULSÕES E2, E4, E8 E EC E ASPECTO VISUAL DO EC.....	87
FIGURA 42 -	EFEITO DA ADIÇÃO DE T80 NA TENSÃO SUPERFICIAL DO EXPERIMENTO E6m.....	90



FIGURA 43 -	ASPECTO VISUAL DAS MICROCÁPSULAS ÚMIDAS IMEDIATAMENTE APÓS MICROENCAPSULAÇÃO.....	91
FIGURA 44 -	RELAÇÃO ENTRE TEOR DE OE (%) COM REDUÇÃO DE MASSA (A) E REDUÇÃO DE DIÂMETRO (B).....	93
FIGURA 45 -	CURVAS DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E SUAS DERIVADAS PARA MICROCÁPSULAS ÚMIDAS E SECAS...	96
FIGURA 46 -	MICROSCOPIA INVERTIDA DAS MICROCÁPSULAS.....	102
FIGURA 47 -	MICROIMAGEM DE MEV DAS MICROCÁPSULAS DESIDRATADAS A 25°C/24h.....	103
FIGURA 48 -	MICROIMAGEM DE MEV DAS MICROCÁPSULAS DESIDRATADAS A 42,5°C/24h.....	104
FIGURA 49 -	MICROIMAGEM DE MEV DAS MICROCÁPSULAS DESIDRATADAS A 60°C/24h.....	105
FIGURA 50 -	MICROIMAGEM DE MEV DAS MICROCÁPSULAS LIOFILIZADAS.....	106
FIGURA 51 -	QUANTIDADE DE TA LIBERADO NOS MEIOS SIMULADOS DE pH 1,2 E 6,8.....	108
FIGURA 52 -	PORCENTAGEM DE LIBERAÇÃO DE TA NOS MEIOS SIMULADOS DE pH 1,2 E 6,8.....	109

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	PENEIRAS GRANULOMÉTRICAS UTILIZADAS NOS TESTES COM ANIS-ESTRELADO.....	38
TABELA 2 -	TESTES DE MOAGEM PARA FRUTOS DE ANIS-ESTRELADO.....	39
TABELA 3 -	PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO $2^{4-1}$ PARA EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO.	42
TABELA 4 -	REMOAGEM DAS FRAÇÕES DE ANIS-ESTRELADO.....	44
TABELA 5 -	PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO $2^{5-2}$ PARA TESTE DE EMULSIFICAÇÃO E ESTABILIDADE.....	48
TABELA 6 -	TESTES PRELIMINARES PARA MICROENCAPSULAÇÃO..	50
TABELA 7 -	ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DO PONTO ÓTIMO DE MICROENCAPSULAÇÃO A PARTIR DE PLANEJAMENTO DCCR.....	52
TABELA 8 -	TESTE GRANULOMÉTRICO NA AMOSTRA COMERCIAL INTEGRAL DE ANIS-ESTRELADO.....	59
TABELA 9 -	FRAÇÕES RETIDAS (Re, %) E ACUMULADAS (Ac, %) NOS ENSAIOS DE MOAGEM.....	61
TABELA 10 -	ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) E EFEITO DO TEMPO E DA MASSA NA MOAGEM PARA OBTER UMA FRAÇÃO FINA (< 425 $\mu$ m).....	63
TABELA 11 -	VALORES PREDITOS E OBSERVADOS PARA MOAGEM DE ANIS-ESTRELADO.....	65
TABELA 12 -	RENDIMENTOS E PRODUTIVIDADES DE OE E TA NA OTIMIZAÇÃO DA HIDRODESTILAÇÃO.....	68
TABELA 13 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA $Y_{BsOE}$ (g OE/100 g bs).....	69
TABELA 14 -	VALORES PREDITOS E OBSERVADOS RENDIMENTO DE TA NO OE ( $Y_{BsTA}$ [g TA/ 100 g bs]).....	71
TABELA 15 -	QUALIDADE DO OEs OBTIDO DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS A DIFERENTES MOAGENS SUBSEQUENTES.....	73

TABELA 16 -	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PARA DIFERENTES OEs EXTRAÍDOS.....	74
TABELA 17 -	VALORES HIPOTÉTICOS E REAIS PARA O HD5 (BASEADOS NA COMPOSIÇÃO DE TA) E COMPARAÇÃO COM O D-lim.....	75
TABELA 18 -	TEORES DE D-LIMONENO E ESTRAGOL NAS AMOSTRAS DE HD.....	77
TABELA 19 -	RESUMO DOS EFEITOS TESTADOS NA HIDRODESTILAÇÃO NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO.....	78
TABELA 20 -	VALORES PREDITOS E OBSERVADOS PARA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE POR TESTE DPPH.....	80
TABELA 21 -	ÍNDICE DE CREMEÇÃO AO FINAL DE 7 DIAS PARA PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO $2^{5-2}$ .....	85
TABELA 22 -	VALORES PREDITOS E OBSERVADOS PARA IC NO TESTE DE EMULSIFICAÇÃO.....	85
TABELA 23 -	DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO E AJUSTE DOS MODELOS DA LEI DA POTÊNCIA E DE BINGHAM ÀS EMULSÕES OBTIDAS.....	88
TABELA 24 -	AJUSTE E SQR DA LEI DA POTÊNCIA E DO MODELO DE BINGHAM APLICADOS ÀS EMULSÕES.....	88
TABELA 25 -	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS FORMADAS NOS TESTES PRELIMINARES DE MICROENCAPSULAÇÃO.....	92
TABELA 26 -	COMPARAÇÃO ENTRE MASSA TEÓRICA SEM UMIDADE (g/100g) E MASSA RESIDUAL DAS MICROCÁPSULAS SECAS (g/g100g).....	94
TABELA 27 -	TEMPERATURAS E DERIVADAS DOS PICOS TERMOGRAVIMÉTRICOS DAS MICROCÁPSULAS.	94
TABELA 28 -	TEMPERATURAS E DERIVADAS DOS PICOS TERMOGRAVIMÉTRICOS DOS COMPONENTES PUROS E DA EMULSÃO E6m.	96
TABELA 29 -	EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO (EE, %)......	97

TABELA 30 -	COMPARAÇÃO DA MÉDIA DO PONTO Enc. C DO PRESENTE ESTUDO COM OUTROS ESTUDOS DE ENCAPSULAÇÃO.....	99
TABELA 31 -	DIÂMETRO MÉDIO DAS MICROCÁPSULAS DO TESTE DE OTIMIZAÇÃO DCCR.....	100
TABELA 32 -	MASSA RESIDUAL E REDUÇÃO DE MASSA DAS MICROCÁPSULAS SUBMETIDAS A DIFERENTES TIPOS DE SECAGEM.....	101
TABELA 33 -	DIÂMETRO MÉDIO DAS MICROCÁPSULAS ANTES DA SECAGEM E APÓS DIFERENTE TIPO DE DESIDRATAÇÃO.....	102
TABELA 34 -	CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DE TA NO VOLUME AMOSTRADO.....	107
TABELA 35 -	LIBERAÇÃO DE TA PARA pHs 1,2 E 6,8 NOS TEMPOS DE AMOSTRAGEM.....	107
TABELA 36 -	QUANTIDADE DE TA LIBERADO A PARTIR DE 400 mg DE MICROCÁPSULAS.....	109
TABELA 37 -	INGESTÃO DIÁRIA SEGURA PARA INGESTÃO DE MICROCÁPSULAS, COM BASE NOS TESTES IN VITRO.....	110

## LISTA DE SIGLAS

ABTS	Método analítico de atividade antioxidante baseado no radical ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico
Ac	Fração acumulada em testes granulométricos (%)
C (i)	Ponto central do planejamento experimental com i repetições
CFT	Método analítico de atividade antioxidante baseado no teor de compostos fenólicos totais ou Folin-Ciocalteau
DPPH	Método analítico de atividade antioxidante baseado no sequestro dos radicais livres por 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DTG	Derivadas da curva termogravimétrica
E (i)	Condições do experimento de emulsificação
EE	Eficiência da encapsulação, dados observados (%)
EEp	Eficiência da encapsulação, dados preditos (%)
EI	Tendência para condição ideal de estabilidade da emulsão
Enc. (i)	Condições do experimento de encapsulação
<i>F</i>	Força que ocorre sobre o anel de Du Nouy (mN)
<i>f</i>	Fator de correção para cálculo da tensão superficial
FRAP	Método de redução do ferro ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> )
G	Condições de granulometria dos frutos de anis-estrelado (µm)
GAE/g OE	Teor de ácido gálico equivalente (mg) por g de OE ou TA, em base seca
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
HD (i)	Condições do experimento de hidrodestilação do planejamento fatorial fracionado
IC	Índice de cremeação (%)
k	Índice de consistência (Pa.s <sup>n</sup> )
m	Massa de anis-estrelado (% , g/mL) destinada à hidrodestilação
M (i)	Diferentes condições de moagem do anis-estrelado
n	Índice de comportamento do fluido
NaAlg	Alginato de sódio
NaAlg,s	Alginato de sódio em solução aquosa (2,5% m/v)
OE	Óleo essencial de anis-estrelado ( <i>Illicium verum</i> Hook)

$r_a$	Raio do anel de Du Nouy (m)
R	Velocidade de homogeneização da emulsificação (rpm)
Re	Fração retida (%) em testes granulométricos
t	Tempo de hidrodestilação (h)
$t_c$	Tempo de amostragem na cinética de liberação (min)
$t_e$	Tempo de emulsificação (min)
$t_m$	Tempo de moagem (s) para planejamento experimental DCCR
$t_p$	Tempo de permanência/maturação na solução salina (min)
T (i)	Condições de remoagem para frutos de anis-estrelado
TA	Trans-anetol
TEAC/g OE	Capacidade antioxidante equivalente a trolox (mmol) por g de OE ou TA em base seca
TG	Curvas termogravimétricas
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2- ácido carboxílico
T80	Tween 80® (emulsificante polisorbato 80)
V	Volume do processo hidrodestilação (mL)
$Y_{BS}$	Rendimento em base seca (g /100 g base seca)



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Nível de significância para testes ANOVA e Tukey
$\sigma$	Tensão de cisalhamento (Pa)
$\sigma_0$	Tensão de cisalhamento inicial (Pa)
$\mu_p$	Viscosidade plástica (Pa.s)
$\gamma$	Taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ )

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1	OBJETIVO GERAL.....	19
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
2.1	ANIS-ESTRELADO.....	20
2.2	APLICAÇÕES DO ANIS-ESTRELADO.....	21
2.3	TOXICIDADE DO ANIS-ESTRELADO.....	22
2.4	TIPOS DE EXTRAÇÃO APLICADAS PARA OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO.....	23
2.5	TESTES PARA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	24
2.5.1	Compostos fenólicos totais (CFT).....	25
2.5.2	Ensaio da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> - FRAP).....	26
2.5.3	Método do radical ABTS.....	27
2.5.4	Ensaio de sequestro dos radicais livres por 2,2-Difenil-1- picrilhidrazila (DPPH).....	28
2.6	ESTUDOS REOLÓGICOS.....	28
2.7	MICROENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL POR GELIFICAÇÃO A FRIO.....	32
2.8	LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS EM AMBIENTE GASTROINTESTINAL.....	35
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL DE ANIS- ESTRELADO.....	38
3.1.1	Testes granulométricos.....	38
3.1.2	Umidade dos frutos triturados e relação com perfil térmico do óleo essencial e do padrão de trans-anetol.....	39
3.1.3	Atividade de água.....	39
3.1.4	Testes de moagem.....	39
3.2	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO.....	40
3.2.1	Testes preliminares por hidrodestilação e por Soxhlet.....	40

3.2.2	Otimização da hidrodestilação por aparelho de Clevenger.....	41
3.3	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO EXTRAÍDO DE ANIS-ESTRELADO	42
3.3.1	Umidade por método de Karl Fischer.....	42
3.3.2	Análises térmicas.....	42
3.3.3	Determinação do teor de trans-anetol por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas.....	43
3.3.4	Remoagem das frações trituras de anis-estrelado comercial.....	44
3.3.5	Determinação do teor de compostos antioxidantes.....	44
3.3.5.1	Pré-tratamento do OE para aplicação nos testes de capacidade antioxidante.....	45
3.3.5.2	Compostos fenólicos totais (CFT).....	46
3.3.5.3	Ensaio da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> - FRAP).....	46
3.3.5.4	Método do radical ABTS.....	46
3.3.5.5	Ensaio de sequestro dos radicais livres por 2,2-Difenil-1- picrilhidrazila (DPPH).....	47
3.4	EMULSIFICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO..	47
3.4.1	Análise microscópica e Distribuição do Tamanho de Gota.....	48
3.4.2	Estabilidade.....	48
3.4.3	Comportamento reológico.....	49
3.4.4	Tensão superficial da emulsão.....	50
3.5	MICROENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS- ESTRELADO.....	50
3.5.1	Testes com emulsões contendo alginato de sódio.....	50
3.5.2	Otimização da microencapsulação.....	52
3.6	ANÁLISES DAS PARTÍCULAS FORMADAS.....	53
3.6.1	Testes de secagem.....	53
3.6.2	Morfologia das microcápsulas úmidas e secas.....	54
3.6.2.1	Microscopia invertida – diâmetro médio das microcápsulas.....	54
3.6.2.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	54
3.7	CINÉTICA DA LIBERAÇÃO DE TRANS-ANETOL EM AMBIENTE DE pH GASTROINTESTINAL – TESTE <i>IN VITRO</i> .....	56
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	58

4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL DE ANIS-ESTRELADO.....	58
4.1.1	Testes granulométricos.....	58
4.1.2	Umidade dos frutos triturados e relação com perfil térmico do óleo essencial e do padrão de trans-anetol.....	59
4.1.3	Atividade de água.....	60
4.1.4	Testes de moagem.....	60
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO.....	66
4.2.1	Testes preliminares por hidrodestilação e por Soxhlet.....	66
4.2.2	Óleo essencial obtido na otimização da hidrodestilação por aparelho de Clevenger.....	67
4.2.3	Remoagem das frações trituradas de anis-estrelado comercial.....	73
4.2.4	Determinação do teor de compostos antioxidantes.....	73
4.3	EMULSIFICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO..	82
4.3.1	Análise microscópica e Distribuição do Tamanho de Gota.....	82
4.3.2	Estabilidade das emulsões formadas.....	84
4.3.3	Comportamento reológico.....	87
4.3.4	Tensão superficial da emulsão.....	89
4.4	MICROENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO.....	90
4.4.1	Testes com emulsões contendo alginato de sódio.....	90
4.4.2	Otimização da microencapsulação.....	97
4.5	ANÁLISES DAS PARTÍCULAS FORMADAS.....	100
4.5.1	Testes de secagem.....	100
4.5.2	Morfologia das microcápsulas úmidas e secas.....	101
4.5.2.1	Avaliação visual das microcápsulas por microscopia invertida.....	101
4.5.2.2	Avaliação visual da microcápsula por microscopia eletrônica de varredura.....	103
4.6	CINÉTICA DA LIBERAÇÃO DE TRANS-ANETOL EM AMBIENTE DE pH GASTROINTESTINAL – TESTE <i>IN VITRO</i> .....	107
5	<b>CONCLUSÃO.....</b>	111
6	<b>SUGESTÕES FUTURAS.....</b>	113

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO A – LISTA DE EQUIPAMENTOS UTILIZADOS E RESPECTIVOS LABORATÓRIOS AOS QUAIS PERTENCEM.....</b>	<b>130</b>
<b>ANEXO B – PREPARO DE SOLUÇÕES.....</b>	<b>133</b>
<b>ANEXO C – COMPROVANTES DE ACEITE E SUBMISSÃO DE ARTIGOS.....</b>	<b>137</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O anis-estrelado chinês (*Illicium verum* Hook) é um vegetal aromático cultivado em países asiáticos, especialmente na China e no Vietnã (ASIF et al., 2016; SUNG; KIM, 2013; WANG; JIANG; WEN, 2007). Seus frutos frescos contêm aproximadamente 3% (m/m) de óleo volátil (óleo essencial), enquanto os desidratados contêm 8-9% (m/m) (WANG; JIANG; WEN, 2007).

O óleo essencial de anis-estrelado é encontrado no pericarpo, mas não na semente, e consiste principalmente de trans-anetol, de 70 a 94% (ASIF et al., 2016; BHADRA et al., 2011; CHOUKSEY; UPMANYU; PAWAR, 2013; DZAMIC et al., 2009; SINGH et al., 2006; WANG; JIANG; WEN, 2007; ZHAI et al., 2009), variando conforme os parâmetros utilizados na extração (DESTRO; JORGE; MATHIAS, 2019). Este composto tem sido cada vez mais estudado devido às suas aplicações na promoção de saúde, seja por suas propriedades antioxidantes (CAI et al., 2013; DESTRO; JORGE; MATHIAS, 2019; WONG; LEE; NURDIYANA, 2014), anticancerígenas (ASIF et al., 2016), pelo seu potencial uso no tratamento de mal de Alzheimer (BHADRA et al., 2011) e para melhorar a resposta imunológica do organismo (PENG et al., 2016).

Para extração deste óleo essencial, a hidrodestilação é o método mais aplicado. Rendimentos que variam de 4% (BHADRA et al., 2011) a 8,2% (WANG; JIANG; WEN, 2007) têm sido relatados na literatura, porém pode levar longo tempo de extração, geralmente de 2 (BHADRA et al., 2011) a 5 h (WANG; JIANG; WEN, 2007). Após extraídos, os óleos essenciais costumam ser muito instáveis na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (ALI et al., 2015; SILVA; MEIRELES, 2015), por isto a microencapsulação de sua solução emulsificada é um processo altamente recomendado para sua conservação (KOO et al., 2014; RAVICHANDRAN et al., 2014; WANG et al., 2016). Ainda, a sua administração na forma de hidroesferas pode ser benéfica em termos protetivos e dirigida ao intestino (CENDON et al., 2018).

Deste modo, o presente trabalho teve por finalidade otimizar a extração do óleo essencial a partir do fruto desidratado de anis-estrelado, verificar sua qualidade em termos de trans-anetol e capacidade antioxidante, e também otimizar sua emulsificação e sua microencapsulação, além de estimar *in vitro* as condições de liberação do composto bioativo no sistema gastrointestinal humano, visando possível aplicação para tratamento de mal de Alzheimer e/ou efeitos anticancerígenos.



## 1.1 OBJETIVO GERAL

Produzir microcápsulas de alginato de cálcio, contendo níveis elevados de óleo essencial de anis-estrelado chinês (OE), com potencial aplicação para fins terapêuticos mediante liberação controlada via ingestão oral.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

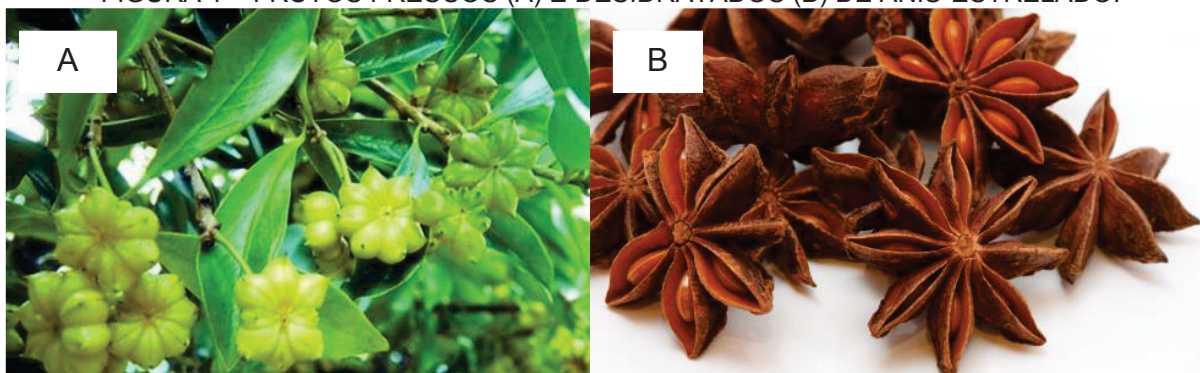
- a. Caracterizar o anis estrelado chinês como matéria-prima de hidrodestilação para produção de OE;
- b. Comparar o OE e a fração lipídica da matéria-prima;
- c. Otimizar a moagem e os demais parâmetros de hidrodestilação para obter melhor produtividade e qualidade OE;
- d. Avaliar o efeito dos parâmetros de hidrodestilação na capacidade antioxidante do OE;
- e. Avaliar comparativamente se há correlação do poder antioxidante do OE por quatro metodologias;
- f. Definir as melhores condições de emulsificação para produção de microcápsulas de hidrogel contendo OE;
- g. Avaliar o efeito da matriz do hidrogel em sua secagem e sua termoestabilidade.
- h. Determinar *in vitro* o efeito do ambiente gastrointestinal na cinética de liberação do composto bioativo, o trans-anetol (TA), a fim de verificar a possibilidade real da aplicação de microcápsulas contendo TA para aprofundamento de estudos visando tratamento de mal de Alzheimer e/ou efeitos anticarcinogênicos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ANIS-ESTRELADO

O anis-estrelado (*Illicium verum* Hook) é um vegetal aromático cultivado especialmente em países asiáticos (ASIF et al., 2016; SUNG; KIM, 2013; WANG; JIANG; WEN, 2007). Seu aroma se deve especialmente ao óleo essencial (OE), correspondendo a cerca de 3% (m/m) nos frutos frescos (FIGURA 1, A) e 8-9% (m/m) nos desidratados (FIGURA 1, B) (WANG; JIANG; WEN, 2007).

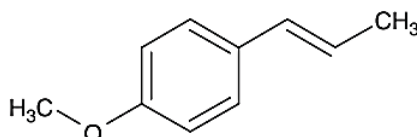
FIGURA 1 – FRUTOS FRESCOS (A) E DESIDRATADOS (B) DE ANIS-ESTRELADO.



FONTE: (A) CNSEED.ORG (2018); (B) LAMBSHOPPE (2018).

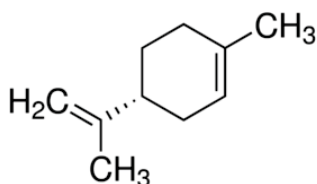
O óleo essencial de anis-estrelado é composto principalmente por trans-anetol (FIGURA 2), pertencente à família dos terpenos, entre 70 e 94% (LIMA et al., 2008; WANG et al., 2011). Ele também pode conter D-limoneno (FIGURA 3), estragol (FIGURA 4), (Z)-anetol, pineno,  $\beta$ -feilandro, safrol, farnesol e  $\alpha$ -terpineol (CHOUKSEY; UPMANYU; PAWAR, 2013; HERRERA, 2009; SCOPEL et al., 2016; SINGH et al., 2006; SUNG; KIM; KIM, 2012).

FIGURA 2 – ESTRUTURA DO TRANS-ANETOL.



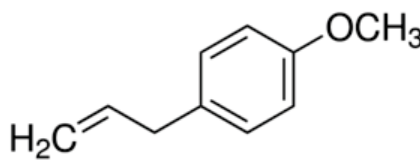
FONTE: CHEMPAKAM e BALAJI (2008).

FIGURA 3 – ESTRUTURA DO D-LIMONENO.



FONTE: SIGMA-ALDRICH (2019).

FIGURA 4 – ESTRUTURA DO ESTRAGOL.



FONTE: SIGMA-ALDRICH (2019b).

A variedade japonesa do anis-estrelado (*Illicium anisatum* L.) é semelhante a *I. verum* Hook, mas seu fruto é menor e com um odor mais fraco (CHEMPAKAM e BALAJI, 2008). Para uso externo, é aplicada por alguns chineses em alguns tratamentos de pele (CHEMPAKAM e BALAJI, 2008; WANG et al., 2011), porém para consumo é altamente tóxica, com efeitos neurológicos e gastrointestinais (IZE-LUDLOW et al., 2004; WANG et al., 2011), podendo ser diferenciada da terapêutica por meio de análise visual (a comestível possui geralmente de 6 a 8 folículos, enquanto que a tóxica possui mais que 9) (WANG et al., 2011) e confirmando-se por cromatografia gasosa, verificando-se o teor de trans-anetol, que na linhagem tóxica não costuma passar de 3% (COOK; HOWARD, 1966; WANG et al., 2011).

## 2.2 APLICAÇÕES DO ANIS-ESTRELADO

O anis-estrelado da variedade comestível é comumente usado como fonte de aromas para a indústria alimentícia, mas também tem aplicações terapêuticas, como tratamento para dor de estômago, vômitos, dores reumáticas, insônia, inflamações da pele (SUNG; KIM; KIM, 2012; WANG et al., 2011). Os frutos também podem ser usados para alívio de cólicas, indigestão, flatulência, paralisia facial, asma e bronquite (CHOUKSEY, D., SHARMA, P., PAWAR, 2010; SUNG; KIM; KIM, 2012).

O anis-estrelado também é a fonte industrial de ácido xiquímico (*shikimic acid*), presente nas sementes e é o ingrediente primário usado para fabricar o medicamento antiviral Tamiflu® (fosfato de oseltamivir), que combate a gripe aviária H5N1 (WANG et al., 2011).

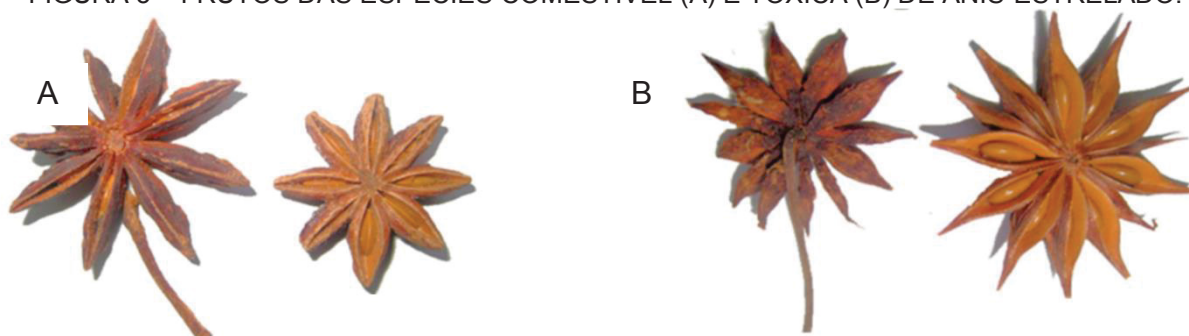
Estudos mais recentes indicam que possui propriedades repelentes de insetos e antimicrobianas, além de haver patente sul coreana sobre o tema (JAE-YEON, 2011).

Quanto ao composto bioativo presente no OE, o trans-anetol (TA), este tem sido cada vez mais estudado devido às suas aplicações na promoção de saúde, seja por suas propriedades antioxidantes (CAI et al., 2013; DESTRO; JORGE; MATHIAS, 2019; WONG; LEE; NURDIYANA, 2014), seja para melhorar a resposta imunológica do organismo (PENG et al., 2016) e ainda mais relevante quanto às suas propriedades anticancerígenas, principalmente em relação às células intestinais (ASIF et al., 2016) e pelo seu potencial uso no tratamento de mal de Alzheimer, pela inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase (BHADRA et al., 2011).

### 2.3 TOXICIDADE DO ANIS-ESTRELADO

A espécie comestível de anis-estrelado é a *Illicium verum* Hook, também conhecida como “anis-estrelado chinês” (FIGURA 5, A). Entretanto, o “falso anis-estrelado”, pertencente à espécie *Illicium anisatum* L., também chamado de “anis-estrelado japonês” e pelos sinônimos *Illicium japonicum* Sieb. e *Illicium religiosum* Sieb. & Zucc (FIGURA 5, B), causa vários efeitos adversos, como vômitos e diarreia, alucinações e convulsões, devido a compostos tóxicos chamados veranisatinas e anisatinas (HOWES; KITE; SIMMONDS, 2009).

FIGURA 5 – FRUTOS DAS ESPÉCIES COMESTÍVEL (A) E TÓXICA (B) DE ANIS-ESTRELADO.



FONTE: WANG et al. (2011).

A distinção pela análise visual revela que a espécie *I. verum* possui de seis a oito folículos dispostos em uma espiral, com carpelos próximos a 10 mm de comprimento, em forma de barco, duros e enrugados, contendo uma semente marrom, ovoide, lisa e brilhante, enquanto que o fruto de *I. anisatum* é caracterizado por mais de 9 folículos, aroma mais fraco e semente mais plana ou levemente esférica (WANG et al., 2011). Deste modo, a análise visual das amostras é altamente recomendada antes do consumo (IZE-LUDLOW et al., 2004).

No caso da toxicidade do anis-estrelado chinês, esta raramente pode ocorrer pelas veranisatinas. Estas são compostos tóxicos extraídos por n-hexano e/ou acetato de etila, que nestes frutos secos costumam ser encontrados em concentrações de  $1,6 \cdot 10^{-5}$  a  $1,6 \cdot 10^{-4}\%$  (m/m). A administração oral de veranisatinas isoladas em doses elevadas (3 mg/kg massa corporal) levou a convulsões e mortes em ratos e camundongos (NAKAMURA; OKUYAMA e YAMAZAKI, 1996; WANG et al., 2011).

Outro composto tóxico possivelmente presente corresponde às anisatinas, presentes em menor quantidade que as veranisatinas, porém com maior toxicidade,

de 1 mg/kg de administração oral (HERRERA, 2009; NAKAMURA; OKUYAMA e YAMAZAKI, 1996). As anisatinas provocam uma grave inflamação dos rins, do trato urinário e dos órgãos digestivos, bem como uma alteração do sistema nervoso (CHEMPAKAM e BALAJI, 2008). O teor de anisatinas na *Illicium anisatum*, se aproxima de 0,021% (NAKAMURA; OKUYAMA e YAMAZAKI, 1996). Nesta espécie tóxica, encontram-se também o safrol e eugenol, que não estão presentes em *I. verum* Hook e que podem ser utilizados para identificar possível contaminação (CHEMPAKAM e BALAJI, 2008; IZE-LUDLOW et al., 2004). A presença desses compostos, assim como das veranisatinas e anisatinas, pode ser verificada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS), analisando-se o padrão espectral (HOWES; KITE; SIMMONDS, 2009; IZE-LUDLOW et al., 2004; WANG et al.; 2011). Por outro lado, a feniculina é um composto que costuma estar presente somente na amostra comestível, sendo também identificada por GC-MS (HOWES; KITE e SIMMONDS, 2009).

Se tratando do composto bioativo do fruto, de acordo com o relatório TRS 891-JECFA 51/18 aprovado pelo Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (*The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA*), em 1998 e ainda em vigor, o trans-anetol como aromatizante alimentar não apresenta risco à saúde humana até uma ingestão diária de 2 mg/kg de peso corporal (WHO/IPCS\_INCHEM, 2018).

## 2.4 TIPOS DE EXTRAÇÃO APLICADAS PARA OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO

De acordo com a Organização Internacional de Normalização (*The International Organization for Standardization - ISO*) no seu vocabulário de Materiais Naturais (ISO/D1S9235.2), óleo essencial é um “Produto obtido a partir de um material vegetal botanicamente definido, por destilação com água ou vapor d’água, ou por prensagem mecânica de citros, sendo o óleo posteriormente separado da fase aquosa por um método físico que não leva a uma mudança significativa em sua composição química” (*European Chemicals Agency - ECHA*, 2018; tradução da autora), geralmente a decantação. Os óleos essenciais costumam ser solúveis em solventes orgânicos, visualmente incolores ou amarelados e muito instáveis na presença de ar, luz, calor,

umidade e metais, além de geralmente apresentar sabor ácido e picante (ALI et al., 2015; SILVA; MEIRELES, 2015).

Com base no reportado em literatura, os meios mais citados para extração de óleo essencial de anis-estrelado (OE) incluem a hidrodestilação (arraste a vapor) (BHADRA et al., 2011; CHEMPAKAM e BALAJI, 2008; LIMA et al., 2008; WANG; JIANG e WEN, 2007; ZHAI et al., 2009) e a extração por CO<sub>2</sub> supercrítico (CHEMPAKAM e BALAJI, 2008; WANG; JIANG e WEN, 2007). Outras metodologias incluem extração por solvente (ASIF et al., 2016; WANG; JIANG e WEN, 2007) e por micro-ondas (ZHAI et al., 2009). Esta última técnica é apontada como sendo de alta eficiência, conveniência e baixo tempo (ZHAI et al., 2009), apesar de ainda ser complexa para aplicação industrial (LI et al., 2012).

No caso da extração com solvente (Soxhlet), há extração de vários compostos e não somente de óleo essencial: ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, lecitinas, ceras, carotenoides, clorofila e outros pigmentos, esteróis, fosfatídeos, vitaminas A e D, (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), além de haver resíduo de solvente, o que compromete o produto final (CAVALCANTI et al., 2011).

A extração supercrítica por CO<sub>2</sub> permite obter OE não tóxico e de boa qualidade, porém a tecnologia é de alto custo e exige maior conhecimento técnico (ASBAHANI et al., 2015; LI et al., 2010).

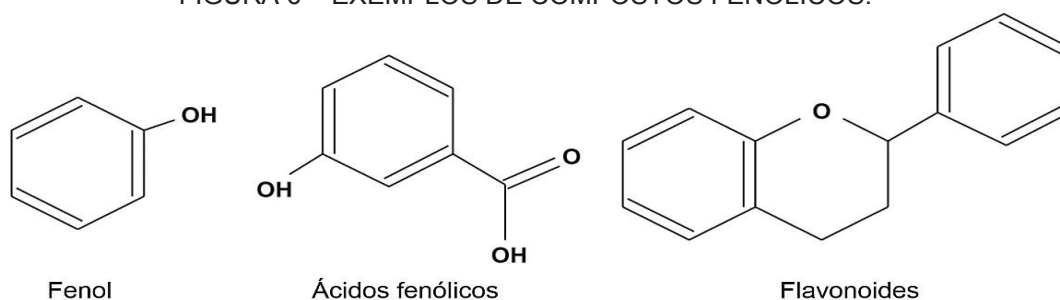
A hidrodestilação, por sua vez, é o procedimento recomendado pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO) em seus Métodos de controle de qualidade para materiais à base de plantas (WHO, 2011), sendo em maiores escalas também conhecida por “arraste a vapor” (OLIVEIRA; SOARES; PICCOLI, 2013; OLIVEIRA et al., 2014; THOSAR et al., 2013).

## 2.5 TESTES PARA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os óleos essenciais podem ser utilizados de acordo com sua capacidade antioxidante. Para isto, um dos testes aplicados é o de compostos fenólicos totais. Estes compostos são substâncias que contêm anéis benzênicos (FIGURA 6) associados a grupos hidroxila. Podem ter como substituintes os grupos amino, monossacarídeos, metil e metoxil. Os compostos de maior interesse são os ácidos fenólicos, fenóis simples, flavonoides, cumarinas, ligninas, taninos e tocoferóis (QUIDEAU et al., 2011).



FIGURA 6 – EXEMPLOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS.



FONTE: Adaptado de LIU (2007).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados pelos vegetais para garantir sua proteção contra fermentos, radiações ultravioletas e infecções, sendo encontrados aproximadamente cinco mil tipos de fenóis na natureza (QUIDEAU et al., 2011). As maiores fontes são as frutas, hortaliças e seus derivados (azeite virgem de oliva, vinho tinto, chás), mas são também encontrados em cereais e leguminosas (SOARES, 2002; LIU, 2005).

O grau de hidroxilação e a posição dos grupos hidroxila na molécula dos compostos fenólicos são fatores que determinam sua atividade antioxidante. A solubilidade e os efeitos estéricos de cada molécula podem ser afetados pelo tipo de estrutura, como no caso dos derivados glicosilados, que podem aumentar ou diminuir a atividade (LIMA, 2008).

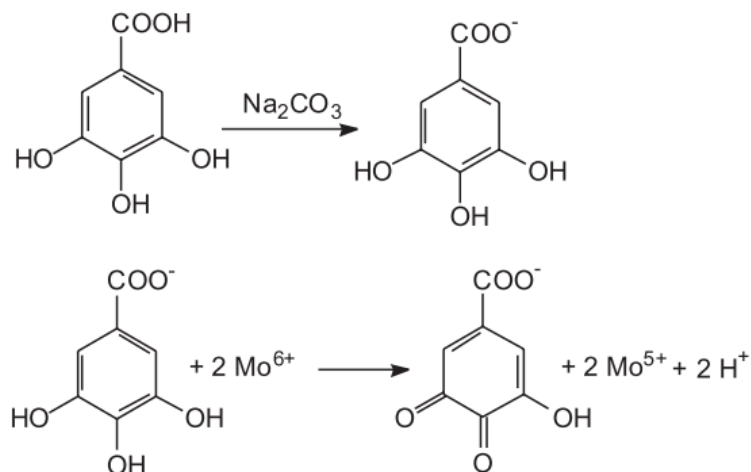
Assim, os compostos fenólicos totais (CFT) podem apresentar característica antioxidante, determinada pelo método de Folin-Ciocalteu (HUANG; OU; PRIOR, 2005; SHAHIDI; ZHONG, 2015). Alternativamente, a capacidade antioxidante *in vitro* pode ser estimada pelo ensaio de sequestro dos radicais livres por composto 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (HUANG; OU; PRIOR, 2005; SHAHIDI; ZHONG, 2015), pelo método de redução do ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power* - FRAP) (HUANG; OU; PRIOR, 2005) e pelo método do radical ABTS (ácido 2,2-azino-bis[3-etilbenzotiazolina]-6-sulfônico) (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

### 2.5.1 Compostos fenólicos totais (CFT)

No método de Folin-Ciocalteu, o reagente é a mistura dos ácidos fosfotúngstico ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) e fosfomolibdico ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ), de coloração amarelada. Ele se reduz ao oxidar os compostos fenólicos em condições alcalinas, produzindo cromóforo de cor azul, provavelmente  $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$  (FIGURA 7), com absorção no

comprimento de onda de 720 a 765 nm (HUANG; OU; PRIOR, 2005; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

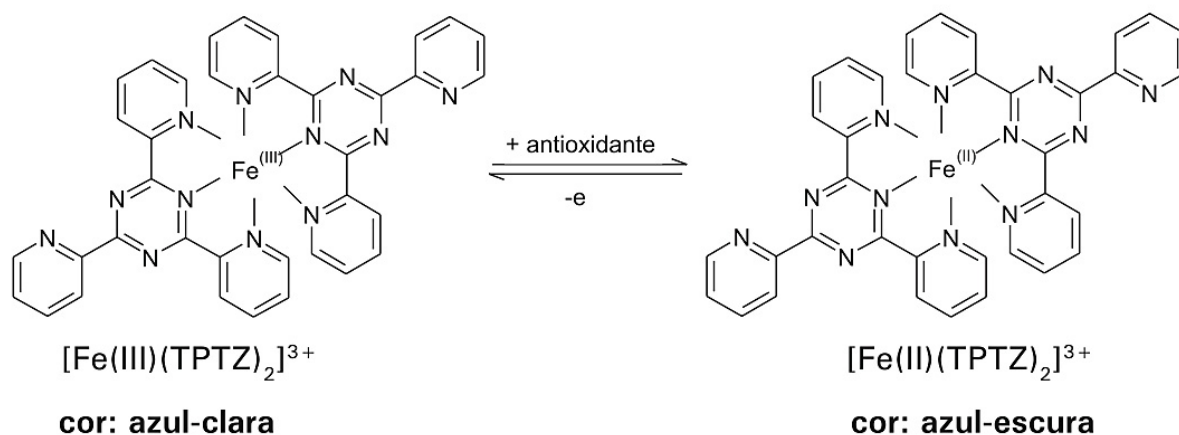
FIGURA 7 - REAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO COM MOLIBDÊNIO, COMPONENTE DO REAGENTE DE FOLIN-CIOCAULTEAU.



FONTE: OLIVEIRA et al. (2009).

### 2.5.2 Ensaio da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power* - FRAP)

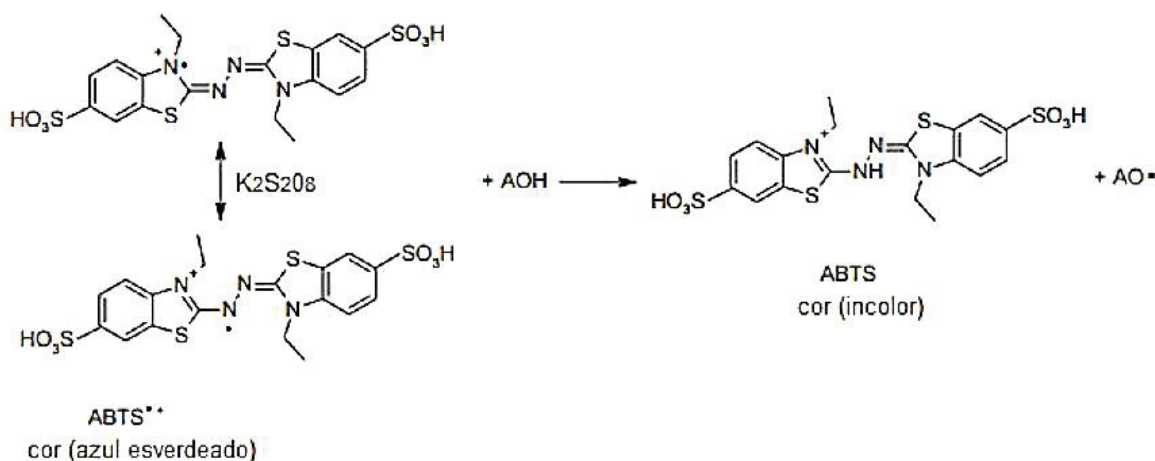
Na metodologia FRAP utiliza-se como oxidante o sal férrico,  $\text{Fe (III) (TPTZ)}_2\text{Cl}_3$  ( $\text{TPTZ} = 2,4,6\text{-tripyridil-s-triazina}$ ), sendo que a reação ocorre em condições ácidas (pH 3,6). O oxidante deve ser preparado por mistura de TPTZ, tampão acetato e cloreto férrico, sendo esta solução denominada "reagente FRAP" (HUANG *et al.*, 2005). A capacidade antioxidante baseia-se na capacidade do antioxidante reduzir o íon  $\text{Fe}^{3+}$  do complexo  $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (FIGURA 8), apresentando cor azul forte e com leitura espectrofotométrica a 593 nm (SHAHIDI; ZHONG, 2015). Os resultados podem ser expressos como micromolar de  $\text{Fe}^{2+}$  ou em relação a um antioxidante padrão, como o trolox (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000).

FIGURA 8 - REDUÇÃO DO COMPLEXO TPTZ (2,4,6-TRI(2-PIRIDIL)-1,3,5-TRIAZINA) COM  $\text{Fe}^{3+}$ .

FONTE: RUFINO et al., (2006).

### 2.5.3 Método do radical ABTS

O método do radical ABTS consiste em utilizar um cromóforo azul-esverdeado ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ), cuja produção ocorre na produção do radical a partir de seu precursor, o ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolína)-6-sulfônico. A solução aquosa de ABTS de amônio dissolvido em água e adicionado de persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), em repouso à temperatura ambiente durante 12-16 h, resulta em uma solução azul escura (HUANG et al., 2005). No meio de reação, o antioxidante reduz o radical monocatión ABTS a novamente ABTS, ocasionando perda da coloração do meio reacional (FIGURA 9), com leitura a 734 nm (RE et al., 1999). Os resultados do teste são expressos em comparação ao Trolox (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

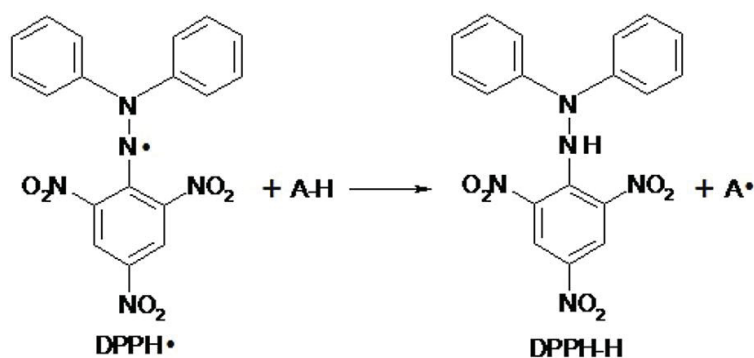
FIGURA 9 – MECANISMO DE REAÇÃO ENTRE RADICAL  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  E O ANTIOXIDANTE.

FONTE: Adaptado de PANNALA et al. (2001).

#### 2.5.4 Ensaio de sequestro dos radicais livres por 2,2-Difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

O ensaio DPPH consiste em utilizar um radical de nitrogênio orgânico, estável, de coloração violeta e que possui absorção de 515 a 520 nm (NOIPA et al., 2011). Quando compostos antioxidante se ligam ao nitrogênio do DPPH• e transferem hidrogênio, a solução passa de cor violeta (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; SHAHIDI; ZHONG, 2015) para cor amarela (FIGURA 10) (WONG; LEE; NURDIYANA, 2014). Seus resultados também podem ser expressos em trolox (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

FIGURA 10 – MECANISMOS DE REAÇÃO ENTRE O RADICAL DPPH• E UM ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA TRANSFERÊNCIA DE UM ÁTOMO DE HIDROGÊNIO.



FONTE: OLIVEIRA (2015).

#### 2.6 ESTUDOS REOLÓGICOS

Além dos testes de capacidade antioxidante, sabe-se que os óleos essenciais devem ser emulsificados para viabilização de produtos com fins terapêuticos (KARAMUSTAFA; ÇELEBI, 2008; VILLAR et al., 2012) ou alimentícios (HASHTJIN; ABBASI, 2015; KAIMAINEN et al., 2015; KOMAIKO; SASTROSUBROTO; MCCLEMENTS, 2015), assim como para produzir filmes lipídicos (ALIHEIDARI et al., 2013; PENG; LI, 2014), filmes comestíveis (ALIHEIDARI et al., 2013) e permitir a nanoencapsulação (LERTSUTTHIWONG et al., 2008) ou a microencapsulação (FERNANDES et al., 2016).

As emulsões são sistemas coloidais que consistem de uma fase oleosa dispersa em uma fase contínua aquosa e um filme interfacial fino de molécula de surfactante em torno de cada gota de óleo, o que pode preservar a aparência dos produtos alimentícios (BASAK; GUHA, 2017; MCCLEMENTS; RAO, 2011), além de

manter as propriedades dos óleos essenciais (NAVARRO et al., 2016). Os surfactantes do tipo ésteres de polioxietileno sorbitano (Tweens), por exemplo, são tensoativos não iônicos de grau alimentício amplamente utilizado devido ao seu baixo custo e fácil disponibilidade (BASAK; GUHA, 2017; YAGHMUR; ASERIN; GARTI, 2002).

O comportamento do fluido é altamente relevante aos processos industriais, sendo que a etapa de homogeneização da solução tem como finalidade estabilizar as emulsões alimentares, especialmente antes de um encapsulamento (FERNANDES et al., 2017). A emulsão pode ser homogeneizada por alta pressão para obter as gotículas de óleo pequenas e uniformes (FERNANDES et al., 2017; LU et al., 2016).

Para investigação das propriedades de fluxo e do tipo de fluido formado na homogeneização, costuma-se aplicar a Lei da Potência (Ostwald-de-Waele, Equação 1) (DIAS, 2016; FERNANDES et al., 2017; NAVARRO et al., 2016):

$$\sigma = k \cdot \gamma^n \quad (1)$$

Onde:

$\sigma$  = tensão de cisalhamento (Pa);

$\gamma$  = taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ );

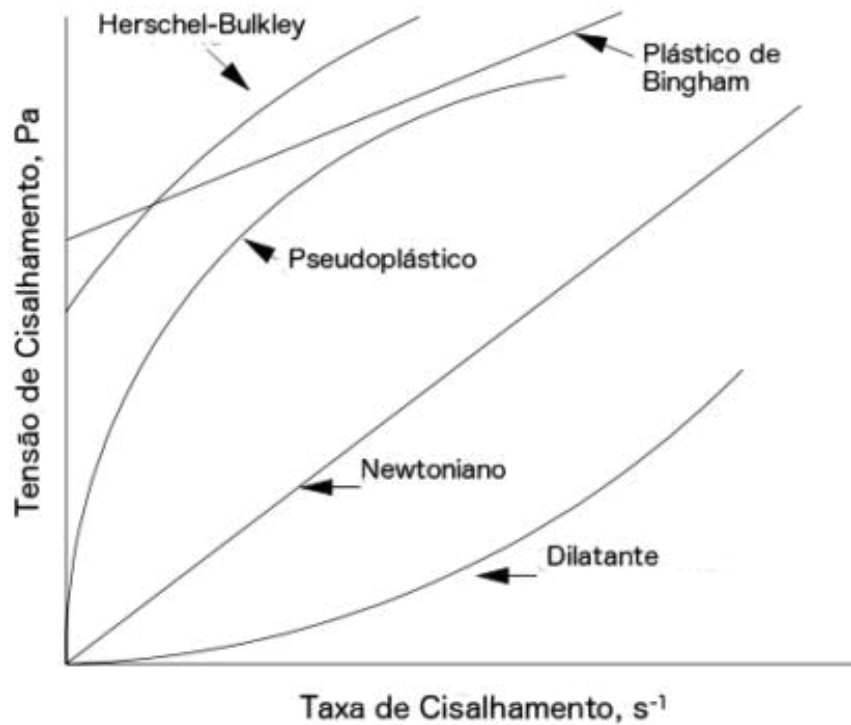
$k$  = índice de consistência ( $Pa \cdot s^n$ );

$n$  = índice de comportamento do fluxo.

As emulsões são consideradas como fluido newtoniano com valores de  $n$  muito próximos a 1, enquanto valores  $n < 1$  são considerados pseudoplásticos e  $n > 1$ , dilatantes (FERNANDES et al., 2017; NAVARRO et al., 2016).

Os fluidos Newtonianos apresentam taxa de cisalhamento diretamente proporcional à tensão de cisalhamento, com início do gráfico na origem (FIGURA 11), enquanto os pseudoplásticos, muito comum em sistemas alimentícios (DO COUTO, 2014), apresentam uma curvatura com concavidade voltada para baixo (diminuição da viscosidade à medida que aumenta a taxa de cisalhamento) e os fluidos dilatantes apresentam curvatura com concavidade voltada para cima (aumento na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento), sendo este comportamento menos comum que o pseudoplástico em alimentos (RAO, 2007; ZUGE, 2015).

FIGURA 11 – COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE FLUIDOS INDEPENDENTES DO TEMPO.



FONTE: Adaptado de STEFFE (1996).

Alguns fluidos, como o plástico de Bingham (Equação 2), mostram relação linear entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação, após vencer a tensão de cisalhamento inicial, o que é um fator muito importante para o dimensionamento de equipamentos (RAO, 2007; ZUGE, 2015).

$$\sigma = \sigma_0 + \mu_p \cdot \gamma \quad (2)$$

Onde:

$\sigma$  = tensão de cisalhamento (Pa);

$\sigma_0$  = tensão de cisalhamento inicial (Pa);

$\gamma$  = taxa de cisalhamento (s⁻¹);

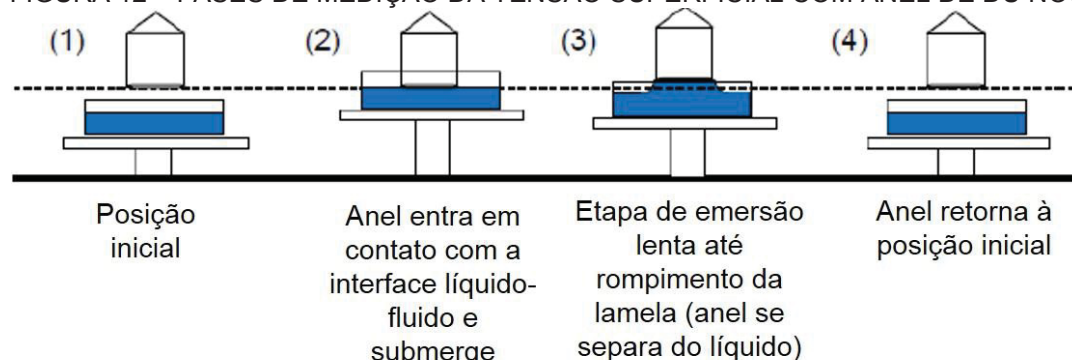
$\mu_p$  = viscosidade plástica (Pa.s).

Além de medidas de viscosidade e identificação do tipo de fluido, a tensão superficial também é um parâmetro relevante de estudo. A presença de tensoativos diminui a tensão, pois reduz as interações não favoráveis entre grupos apolares e água. Os tensoativos, em função do grupo lipofílico, ocupam a superfície da emulsão,

reduzindo a força de coesão entre as moléculas do solvente e, com isto, tensão superficial. Após saturação da superfície, no entanto, o aumento na concentração de tensoativo não apresenta mais efeito sobre o valor da tensão superficial, indicando que atingiu a concentração micelar crítica (CMC), com formação espontânea de agregados moleculares coloidais (micelas). A CMC depende da estrutura do tensoativo e das condições experimentais. Tais condições são de extrema importância para aplicações industriais (BEHRING et al., 2004; SANTOS et al., 2007; SANTOS; PANAGIOTOPOULOS, 2016).

A tensão superficial e CMC podem ser determinadas utilizando-se tensiômetro, a partir do método de Du Nouy, também conhecido como Método do anel (DU NOUY, 1919; NINO, 2014; RAJABI et al., 2015) em que um anel metálico circular é suspenso por uma balança de precisão, havendo uma base ajustável de altura a fim de aproximar o fluido até entrar em contato com o anel. Em seguida, o recipiente é novamente abaixado para esticar a película de líquido que se forma em torno do anel (FIGURA 12).

FIGURA 12 – FASES DE MEDIÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL COM ANEL DE DU NOUY.



FONTE: ADAPTADO DE NINO (2014).

A tensão superficial ( $\gamma$ , mN/m, Equação 3) que ocorre sobre esse anel (GHOSH, 2013; KYOWA, 2015), em função da força de emersão no líquido (FIGURA 13), é dado por:

$$\gamma = \frac{F}{4\pi r} \cdot f \quad (3)$$

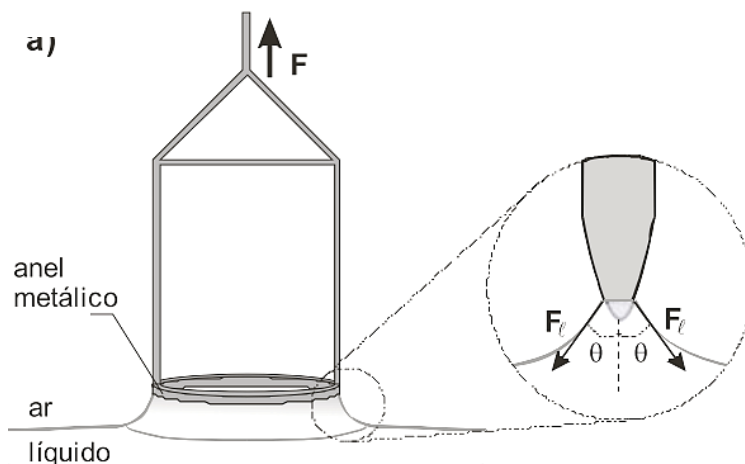
Onde:

$F$  = força que ocorre sobre o anel de Du Nouy (mN);

$r$  = raio do anel (m);

$f$  = fator de correção para cálculo da tensão superficial.

FIGURA 13 – ESQUEMATIZAÇÃO DAS FORÇAS ATUANTES NA EMERSÃO DO ANEL DE DU NOUY.



FONTE: Adaptado de NINO (2014).

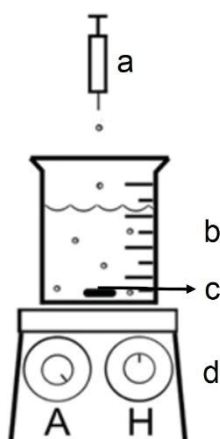
Com isto, o tensiômetro pode calcular a tensão superficial a partir da força aplicada em uma área determinada (BEHRING et al., 2004; ZUGE, 2015).

## 2.7 MICROENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL POR GELIFICAÇÃO A FRIO

Sobre a microencapsulação de óleo essencial emulsificado de anis-estrelado, é citada em literatura a técnica de *spray-dryer*, neste caso para a fabricação de aroma, variando condições de goma-arábica e maltodextrina (WANG; WANG e LONG, 2008) e maltodextrina e proteína de soja (WANG et al., 2014). Como busca-se uma encapsulação via gelificação/gotejamento a frio (FIGURA 14, A) evitando degradação de compostos termossensíveis e visando uso terapêutico de microcápsulas e utilizando-se seringa laboratorial, podem ser citadas as metodologias para óleo comercial de laranja doce (*Citrus sinensis*; LIU; XU E WANG, 2012) e licopeno de toranja (*Citrus paradisi*) (CALVO; BUSCH e SANTAGAPITA, 2017) ambas matrizes oleosas, com estudos de variação do teor de cloreto de cálcio na solução salina de maturação, tensoativos para formação da emulsão e de alginato de sódio.



FIGURA 14 – ESQUEMA DA MICROENCAPSULAÇÃO USANDO SERINGA.

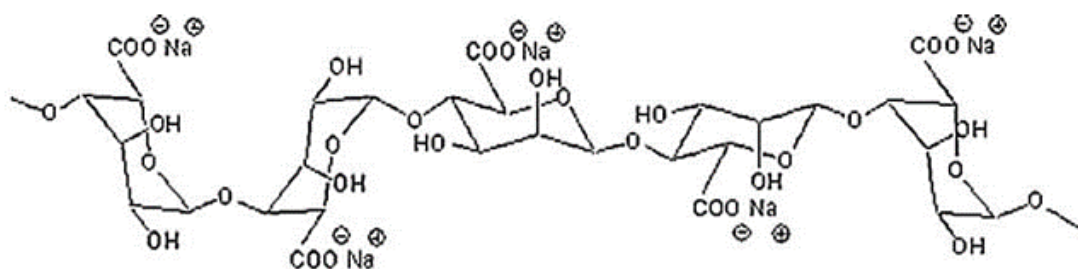


FONTE: Adaptado de CENDON et al. (2018).

LEGENDA: (a) Seringa contendo solução com material bioativo;  
 (b) Béquer contendo solução salina de maturação;  
 (c) Barra magnética;  
 (d) Agitador magnético;  
 (A) Controle da agitação;  
 (H) Controle de aquecimento (não necessário).

O alginato de sódio (FIGURA 15) é um polímero natural e hidrossolúvel proveniente de algumas bactérias e de algas marrons, principalmente *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* (GOMBOTZ; WEE, 1998). Sua composição é uma combinação de unidades dos ácidos  $\beta$ -D-manurônico e  $\alpha$ -L-gulurônico, unidos por ligação (1 $\rightarrow$ 4) (HORST, 2009; KING, 1988; KING, 1988; MULLER, 2011).

FIGURA 15 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ALGINATO DE SÓDIO.

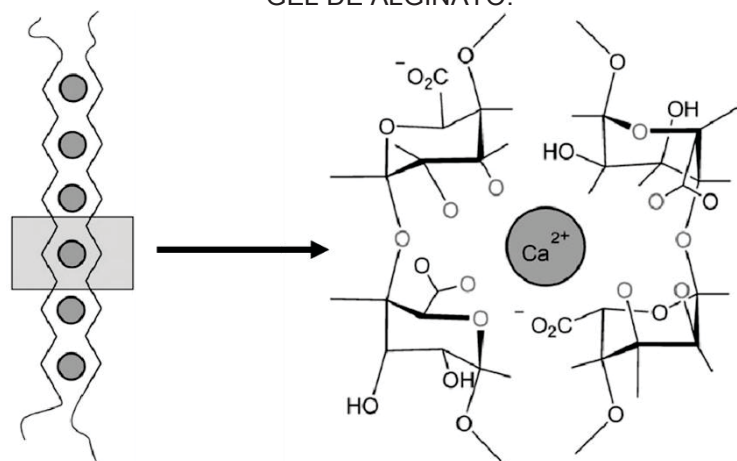


FONTE: HORST (2009).

O alginato de sódio é usado em várias aplicações alimentares e também terapêuticas, incluindo microencapsulação (WANG et al., 2016), a qual possibilita a administração oral de fármacos, benéfica em termos protetivos e dirigida ao intestino (CENDON et al, 2018). Estruturalmente, grupos carboxila que dissociam ou

incorporam prótons ( $H^+$ ) afetam o comportamento do alginato de acordo com o pH. Um pH inferior ao pKa dos constituintes ( $pK_{a\beta\text{-D-manurônico}} = 3,38$ ;  $pK_{a\alpha\text{-L-gulurônico}} = 3,65$ ) promove incorporação de prótons e o polímero se insolubiliza, protegendo o medicamento encapsulado. Em acidez acima dos pKa, ocorre liberação do fármaco pela solubilização do alginato (CENDON, 2014; WILSON; CROWLEY, 2011). Para insolubilização, faz-se gotejamento da emulsão com alginato de sódio em soluções de cloreto de cálcio, cátion divalente, que interagindo com a carboxila do ácido gulurônico do alginato forma hidrogel na estrutura “eggbox” (FIGURA 16) (CLARK; ROSS-MURPHY, 1987; LEICK et al., 2010). Tal hidrogel possui capacidade de absorver água (DE SOUZA JUNIOR, 2006), o que em meio de liberação aquoso promove a liberação da substância microencapsulada (CAVALLIERI, 2007).

FIGURA 16 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO MODELO “CAIXA DE OVO” PARA FORMAÇÃO DE GEL DE ALGINATO.



FONTE: Adaptado de LEICK et al. (2010).

Para a emulsificação de óleos essenciais, relatam-se concentrações de 1% (HASHTJIN; ABBASI, 2015) a 10% (BASAK; GUHA, 2017) de óleo. O alginato de sódio costuma ser aplicado de 1% (CALVO; BUSCH e SANTAGAPITA, 2017) até 2,5% (ABANG; CHAN; PONCELET, 2012).

O emulsificante T80 (éster de polioxietileno sorbitano, “Tween”), tensoativo não iônico de grau alimentício muito utilizado devido ao seu baixo custo e fácil disponibilidade (BASAK; GUHA, 2017; YAGHMUR; ASERIN; GARTI, 2002), tem sido aplicado nas concentrações de 1,0% (LERTSUTTHIWONG et al., 2008) a 2,0% (ZHU et al., 2013; ZÜGE et al., 2013).

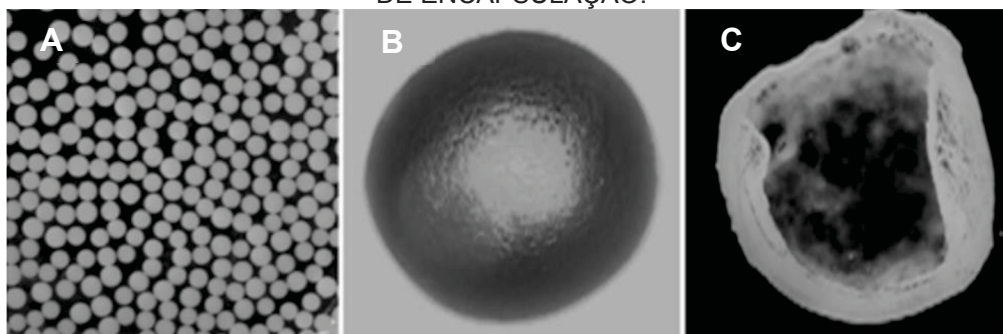
A agitação da emulsão deve ser promovida preferencialmente em homogeneizador, no mínimo de 5.000 rpm (NAVARRO et al., 2016) ou 10.000 rpm

(LUPO et al., 2014; ZÜGE et al., 2013), por um tempo de 1 min (NAVARRO et al., 2016) a 2 min (KOMAICO; SASTROSUBROTO e MCCLEMENTS, 2015; LERTSUTTHIWONG et al., 2008; PENICHE et al., 2004).

Para microencapsulação, a emulsão formada deve ser gotejada sob uma solução salina, geralmente  $\text{CaCl}_2$ , a qual pode ter concentração de 1,5% (m/V) (LIU; XU e WANG, 2012) a 2,5% (m/v) (CALVO; BUSCH; SANTAGAPITA, 2017; LIU; XU e WANG, 2012; YAN et al., 2014) e tempo de permanência no  $\text{CaCl}_2$ , de 1 min (OTÁLORA et al., 2016) a 30 min (ABANG; CHAN e PONCELET, 2012; CALVO; BUSCH; SANTAGAPITA, 2017; LIU; XU e WANG, 2012).

Nas proporções ideais dos reagentes citados, a análise da superfície da microcápsula (FIGURA 17) verifica a integridade do revestimento de alginato, que contribui para evitar a perda de composto bioativo volátil e sua oxidação durante armazenamento (DELADINO et al., 2008).

FIGURA 17 - MORFOLOGIA E MICROESTRUTURA DE MICROCÁPSULAS EM CONDIÇÃO ÓTIMA DE ENCAPSULAÇÃO.



FONTE: LIU; XU E WANG (2012).

LEGENDA: (A) Forma do produto;  
(B) Característica de superfície;  
(C) Estrutura interna.

## 2.8 LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS EM AMBIENTE GASTROINTESTINAL

O estudo de liberação de fármacos encapsulados em ambiente gastrointestinal tem como primeira etapa a realização de testes *in vitro*, a partir do uso de meios gástrico e intestinal simulados, usando ou não enzimas. Para isto, uma série de recomendações são realizadas por diversos órgãos, dentre eles a Farmacopeia dos Estados Unidos (*The United States Pharmacopeia* - USP), a Farmacopeia internacional (*The International Pharmacopoeia* - IntPh) (STIPPLER; KOPP; DRESSMAN, 2004) e a Farmacopeia Brasileira (AGÊNCIA NACIONAL DE

VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2010). Somente após testes *in vitro*, que caracterizam a viabilidade de administração, são realizados testes consecutivos de esterilidade, pH, proteínas, atividade ou potência por método *in vivo* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2010).

No caso dos testes de liberação de fármacos de administração oral, podem ser utilizados os tempos de estudos similares aos que as partículas sólidas permanecem em ambiente gastrointestinal, sendo de uma hora e trinta e cinco minutos (1h35min) para ambiente estomacal e de três horas e cinquenta e cinco minutos (3h55min), para intestinal (GRAFT; BRINCH; MADSEN, 2001).

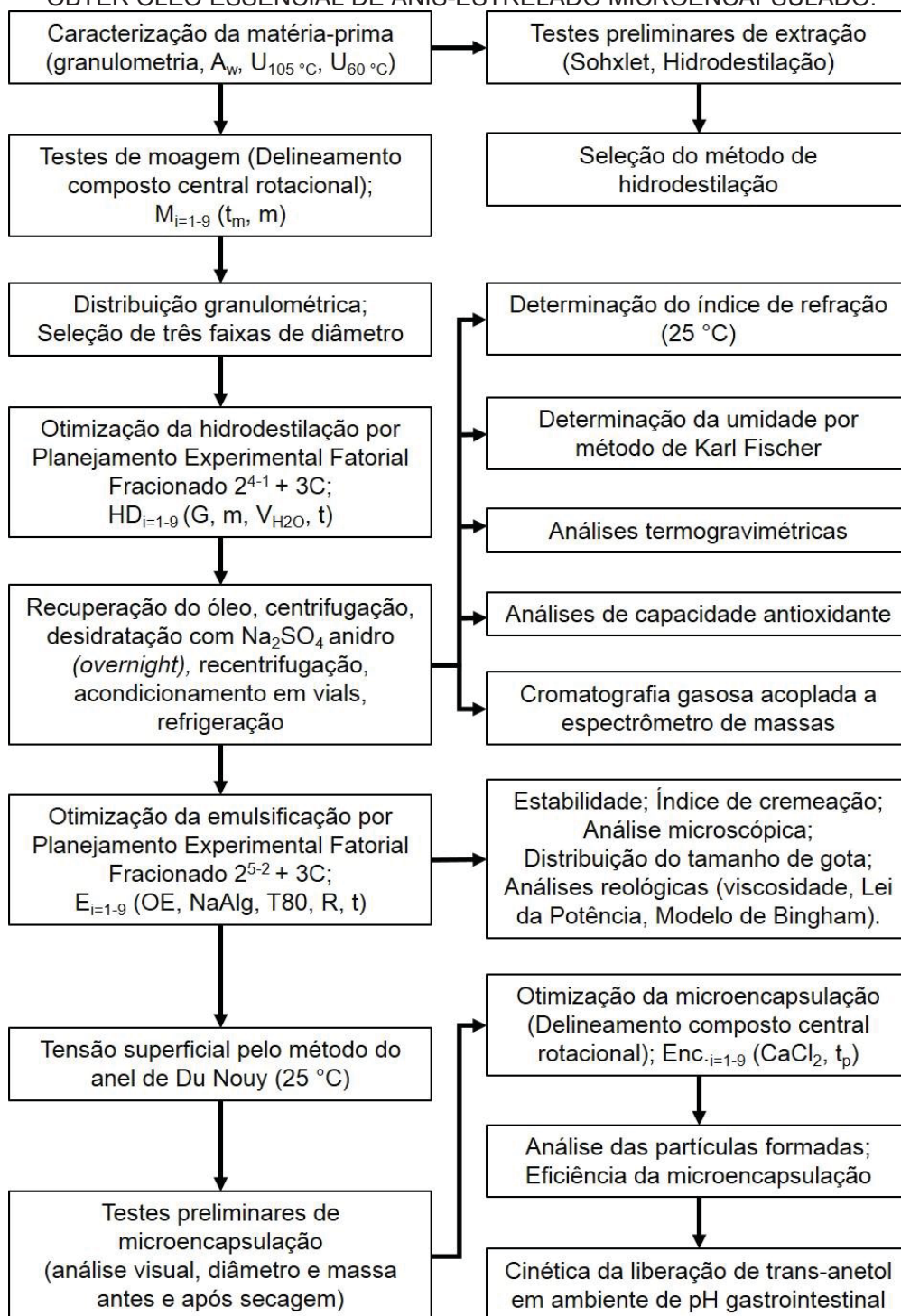
Para o TA, especificamente, estudos prévios em roedores demonstraram que em 120 min de teste a absorção gástrica atinge 54%, enquanto a intestinal se aproxima de 76% (FRITSCH; BLANQUAT; DERACHE, 1975).

Dentro do exposto supracitados, o presente estudo envolveu a produção de óleo essencial (OE) de anis-estrelado chinês na condição de maior produtividade e de maior teor de seu principal composto bioativo, o trans-anetol (TA). A otimização da emulsão desse óleo para a produção de microcápsulas, bem como a cinética de liberação com base no pH do sistema gastrointestinal para administração dirigida, visando posteriores estudos no tratamento do mal de Alzheimer e/ou atividade anticarcinogênica intestinal por administração de OE com alto teor de TA, ocorreram conforme detalhado a seguir.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas desenvolvidas no presente trabalho podem ser observadas resumidamente na FIGURA 18. Os equipamentos utilizados e os respectivos laboratórios aos quais pertencem estão listados no ANEXO A.

FIGURA 18 – ETAPAS DE CARACTERIZAÇÃO, EXTRAÇÃO E OTIMIZAÇÕES APLICADAS PARA OBTER ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO MICROENCAPSULADO.



### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL DE ANIS-ESTRELADO

A amostra comercial de frutos de anis-estrelado foi obtida da Flora Ervas Comercial Ltda (São José dos Pinhais, PR), em embalagens de 1 kg. As amostras passaram por controle de qualidade microscópico e macroscópico, assim que importadas pela empresa, para verificar a identidade da espécie comestível *Illicium verum* Hook.

Em função da presença de compostos aromáticos, o anis-estrelado foi armazenado sob refrigeração (aproximadamente 5°C) até o momento das análises, no Laboratório de Inovação e Otimização de Produto e Processo (LIOPP), da Usina Piloto B (UFPR Politécnico).

Previamente às análises, foi realizado o quarteamento da amostra homogeneizada, para garantir confiabilidade principalmente quanto a granulometria inicial (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

#### 3.1.1 Testes granulométricos

Os testes granulométricos aplicados ao anis-estrelado comercial tiveram como finalidade verificar as condições nas quais a matéria-prima chegaria à indústria, além de avaliar possíveis variações no rendimento da extração via hidrodestilação. As peneiras granulométricas utilizadas (BERTEL®) têm suas características de porosidade apresentadas na TABELA 1.

TABELA 1 – PENEIRAS GRANULOMÉTRICAS UTILIZADAS NOS TESTES COM ANIS-ESTRELADO.

Mesh	Abertura (µm)	D <sub>m</sub> <sup>1</sup> (µm)	
8	2360	2180	1700
9	2000		
12	1400	1290	1015
14	1180		
20	850	725	512,5
28	600		
35	425	362,5	
48	300		
100	150	75	225
Fundo	Fundo		

<sup>1</sup> Diâmetro médio. FONTE: A autora (2018).

A distribuição granulométrica de 100 g de amostra, em triplicatas, foi realizada sob 10 min de agitação em equipamento com peneiras vibratórias (BERTEL®).



### 3.1.2 Umidade dos frutos triturados e relação com perfil térmico do óleo essencial e do padrão de trans-anetol

O teor de umidade inicial do fruto previamente moído (WHO, 2011) em um liquidificador (20 g por 20 s), foi determinada em triplicata por secagem em estufa 105 °C (AOAC, 2000; SHREVE; THIEX e WOLF, 2006) (QUIMIS®, Brasil). Um método alternativo com secagem por infravermelho também foi aplicado em triplicata em equipamento System BG-200 (GEHAKA®) à 60°C e 105°C até massa constante (aproximadamente 15 min). Os resultados dos métodos para determinação de umidade nos frutos secos foram comparados aos dados de análises térmicas para óleo essencial obtido por hidrodestilação (metodologia item 3.2.1) a fim de verificar condição de secagem com menor perda de composto bioativo em estudo (trans-anetol).

### 3.1.3 Atividade de água

A atividade de água das amostras comerciais trituradas foi obtida por equipamento Aqualab Pre (DECAGON®), a 25°C, em triplicatas.

### 3.1.4 Testes de moagem

A pré-fragmentação da matéria-prima é indicada para aumentar a produção de óleo a partir do processo de hidrodestilação (CAI et al., 2014; LI et al., 2010), e foi realizada usando um liquidificador doméstico (Clic'Lav, ARNO®).

Para os ensaios de moagem (M), em duplicatas, os efeitos de tempo ( $t_m$ ) e massa (m) foram avaliados em duplicata por meio de Delineamento composto central (TABELA 2), pelo software STATISTICA 7® - *Trial Version* (StatSoft, Inc.).

TABELA 2 - TESTES DE MOAGEM PARA FRUTOS DE ANIS-ESTRELADO.

Testes	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	MC (i) <sup>3</sup>
$t_m^1$ (s)	10 (-1)	10 (-1)	20 (+1)	20 (+1)	8 <sup>4</sup> (-1,41)	22 <sup>5</sup> (+1,41)	15 (0)	15 (0)	15 (0)
$m^2$ (g)	10,00 (-1)	20,00 (+1)	10,00 (-1)	20,00 (+1)	15,00 (0)	15,00 (0)	7,93 (-1,41)	22,07 (+1,41)	15,00 (0)

<sup>1</sup>Tempo de moagem. <sup>2</sup>Massa de anis-estrelado desidratado adicionada ao sistema de moagem. <sup>3</sup>Ponto central, em duplicata, i = 1-2. <sup>4</sup>Aproximadamente 8 s. <sup>5</sup>Aproximadamente 22 s.

As frações retidas (Re, %) e acumuladas (Ac, %) em cada peneira e o perfil de trituração foram apresentados no item 4.1.4 da presente tese.

### 3.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO

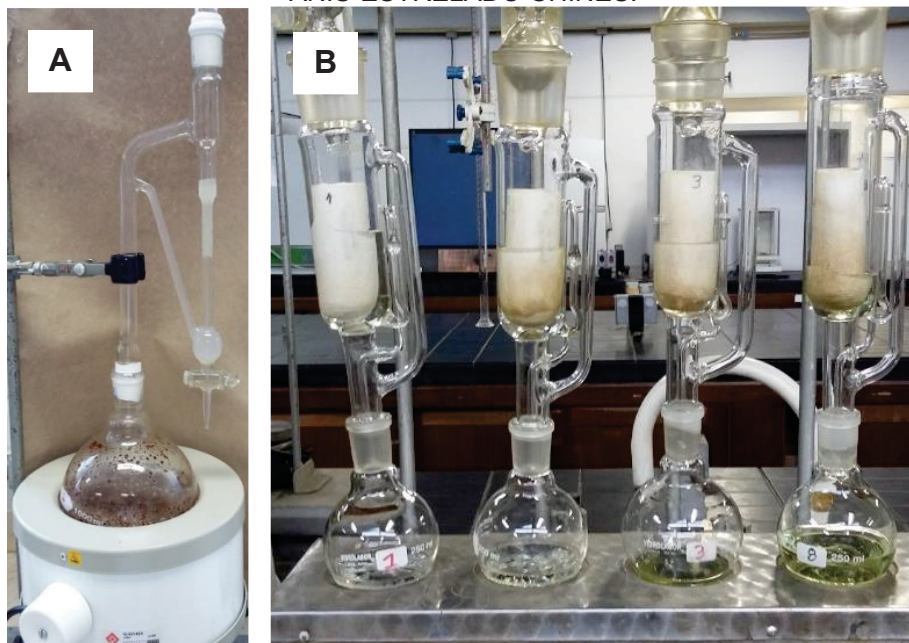
#### 3.2.1 Testes preliminares por hidrodestilação e por Soxhlet

A fim de testar os equipamentos de extração e comparar a eficiência da obtenção e qualidade do óleo essencial de anis-estrelado, foram utilizados frutos secos (50g), triturados (liquidificador doméstico, Clic'Lav, ARNO®; 20 g de amostra por 20 s em alta potência) e na forma integral, combinados com água destilada (500 mL) e sistema aquecido em aparelho Clevenger (FIGURA 19, A) por 3h, usando manta de aquecimento QUIMIS® (Q-321A25, 315 W). Após resfriamento, o óleo foi centrifugado (10.000 rpm, 5 min = 14.257 xg, 5 min) em centrífuga (Centrifuge Heraeus Fresco 21, THERMO SCIENTIFIC®) em microtubos (1,5 mL). A fase lipídica foi transferida para outro conjunto de microtubos contendo aproximadamente 7% (m/v) de sulfato de sódio anidro (CAS 7757-82-6, ANALYTICALS®). Este sal é comumente usado como um agente de secagem de óleo (ZHAI et al., 2009). Os óleos desidratados foram subsequentemente armazenados sob refrigeração ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) (BHADRA et al., 2011; CHEMPAKAM e BALAJI, 2008; WANG; JIANG e WEN, 2007), e após estabilização (*overnight* - durante a noite), outra centrifugação foi realizada sob as mesmas condições. O óleo essencial seco foi hermeticamente condicionado em frascos âmbar e armazenado sob refrigeração.

Como método alternativo para verificar qualidade da fração lipídica do anis-estrelado, uma extração clássica de Soxhlet (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008) (FIGURA 19, B) foi realizada em duplicata usando éter etílico (CAS 60-29-7, NUCLEAR®) para extrair a fração lipídica de 8 g de cada amostra (triturada e integral) envolta em papel filtro Qualy 15.0 Ø (J. PROLAB®) e tampado com algodão por 5 h a  $85^\circ\text{C}$ . O rendimento da fração lipídica foi determinado após o solvente ter evaporado por 60 min a  $100^\circ\text{C}$ . A fração oleosa extraída pelo método Soxhlet recebeu o mesmo tratamento e armazenamento descrito previamente para o hidrodestilado.



FIGURA 19 – SISTEMAS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E DA FRAÇÃO LIPÍDICA DO ANIS-ESTRELADO CHINÊS.



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: (A) Hidrodestilação pelo método de Clevenger  
(B) Extração de fração lipídica pelo método de Soxhlet.

### 3.2.2 Otimização da hidrodestilação por aparelho de Clevenger

O efeito da granulometria, massa de frutos secos, tempo de extração e volume de água no rendimento de óleo essencial de anis-estrelado extraído por hidrodestilação (OE) foi avaliado usando um planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  implementado no *software* STATISTICA 7® (StatSoft, Inc.), com ponto central em triplicata (TABELA 3). Os níveis foram estabelecidos de acordo com pesquisas anteriores e testes preliminares. Para granulometria, partículas pequenas, idealmente entre 250  $\mu\text{m}$  (60 mesh) e 425  $\mu\text{m}$  (40 mesh), têm sido usadas para resultar em maior rendimento de anis-estrelado OE (CAI et al., 2014; LI et al., 2010). Portanto, optou-se por trabalhar com faixas de 425  $\mu\text{m}$  para o presente estudo.

Massas entre 8 e 16% (m/v) foram usadas (WANG; JIANG e WEN, 2007; ZHAI et al., 2009). Em relação ao tempo de extração, testes preliminares indicaram estabilização do volume de óleo essencial obtido em até 3 h (dados não mostrados). O volume de água destilada variou de 200 mL (quantidade mínima necessária para o preenchimento do sistema), a 500 mL (máximo para operação segura). As variáveis de resposta foram rendimento de óleo essencial e de TA em base seca ( $Y_{BS}$ , em g OE /100 g matéria seca) e teor de trans-anetol (TA, %).

O índice de refração para cada amostra foi medido em refratômetro Abbe (BIOBRIX®), a 25°C (GARBER; HERRLINGER e CIESIELSKI, 1962; TUAN e ILANGANTILEKET, 1997).

TABELA 3 - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2<sup>4-1</sup> PARA EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO.

Testes	G (µm) <sup>1</sup>	m (%) <sup>2</sup>	t (h) <sup>3</sup>	V (mL) <sup>4</sup>
HD1	< 425 (-1)	8 (-1)	1 (-1)	200 (-1)
HD2	> 850 (+1)	8 (-1)	1 (-1)	500 (+1)
HD3	< 425 (-1)	16 (+1)	1 (-1)	500 (+1)
HD4	> 850 (+1)	16 (+1)	1 (-1)	200 (-1)
HD5	< 425 (-1)	8 (-1)	3 (+1)	500 (+1)
HD6	> 850 (+1)	8 (-1)	3 (+1)	200 (-1)
HD7	< 425 (-1)	16 (+1)	3 (+1)	200 (-1)
HD8	> 850 (+1)	16 (+1)	3 (+1)	500 (+1)
HD C (i) <sup>5</sup>	425 < G < 850 (0)	12 (0)	2 (0)	350 (0)

<sup>1</sup>Granulometria do anis-estrelado triturado. <sup>2</sup>Massa de amostra adicionada ao sistema. <sup>3</sup>Tempo do processo de hidrodestilação. <sup>4</sup>Volume de água destilada adicionada ao sistema. <sup>5</sup>Ponto central, em triplicata, i = 1-3.

Os dados foram submetidos a teste ANOVA em STATISTICA 7® (StatSoft, Inc.) e a teste de Tukey em suplemento *Action Stat* (Estat Camp), para Excel® (Microsoft Corporation). Um intervalo de confiança de 95% foi usado.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO EXTRAÍDO DE ANIS-ESTRELADO

#### 3.3.1 Umidade por método de Karl Fischer

A umidade dos OEs e padrão de TA (CAS 4180-23-8, EASTMAN CHEMICAL COMPANY®) foi avaliada de acordo com a metodologia oficial do método de Karl Fischer (AOAC, 2000; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), em equipamento V30 *Compact Volumetric KF Titrator* (METTLER TOLEDO®, EUA).

#### 3.3.2 Análises térmicas

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada em 10 µL de OE ou TA padrão em cadinhos de platina (200 µL) em TGA 4000 (PERKIN ELMER®) em atmosfera de nitrogênio de alta pureza (50 mL/min) de 30 a 410°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min (OTÁLORA et al., 2016).

Os dados das curvas termogravimétricas (TG) foram plotados com o auxílio do programa Origin Pro 8.6® (*OriginLab Corporation*). Também foram plotadas as curvas de termogravimetria derivada (DTG), que correspondem a derivada primeira da curva TG. As curvas derivadas DTG representam a velocidade de perda de massa ( $\%.\text{min}^{-1}$ ) (MARQUES, 2014).

### 3.3.3 Determinação do teor de trans-anetol por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas

Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS; GC-2010 Plus, SHIMADZU®, Japão, FIGURA 20), foi conduzida com base em BHADRA et al. (2011), usando coluna capilar DB5 (30 m x 0,32 mm, espessura do filme 0,25  $\mu\text{m}$ , J & W Scientific Inc., Folsom, CA, E.U.A.) com fenilmetil-silicone 5% reticulado. A fase móvel também foi o gás hélio, mas a uma taxa de fluxo de 1,2 mL/min. A temperatura do forno foi isotérmica a 40°C durante 5 min, depois aumentou a 5°C/min até 220°C, temperatura na qual foi mantido isotérmico por 10 min. Para a injeção, a temperatura foi de 220°C, e para a interface, 200°C. No presente estudo, o volume de injeção utilizado foi de 1,0  $\mu\text{L}$ , a razão de divisão de 1:20 e os componentes da amostra analisados na faixa de 45 a 250  $\text{g}.\text{mol}^{-1}$ . TA em OEs foi identificado por dados espectrais de massa da biblioteca virtual NIST/EPA/NIH e quantificado usando a curva padrão.

FIGURA 20 – EQUIPAMENTO CROMATOGRÁFICO GC-MS.



FONTE: A autora (2019).

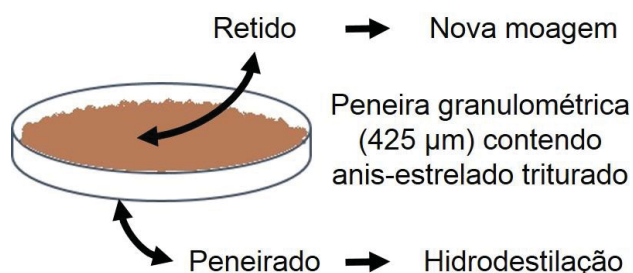
### 3.3.4 Remoagem das frações trituradas de anis-estrelado comercial

No intuito de verificar possibilidade de reaproveitamento das amostras de anis-estrelado de granulometria superior a 425  $\mu\text{m}$ , verificou-se a qualidade do óleo obtido com remoagens do fruto (20 g por 20 s) (TABELA 4), em duplicatas. A cada trituração, foi removida a fração inferior a 425  $\mu\text{m}$  (FIGURA 21), sendo esta destinada à extração na condição HD1 (TABELA 3).

TABELA 4 – REMOAGEM DAS FRAÇÕES DE ANIS-ESTRELADO.

Ensaio	Descrição da amostra
T1	Triturada 1 vez (1x 20 s)
T2	Triturada 2 vezes (2x 20 s)
T3	Triturada 3 vezes (3x 20 s)
T4	Triturada 4 vezes (4x 20 s)
T5	Triturada 5 vezes (5x 20 s)

FIGURA 21 – ESQUEMA DA SELEÇÃO DO MATERIAL TRITURADO PARA REMOAGEM E HIDRODESTILAÇÃO.



FONTE: A autora (2019).

Também foram analisados para estes óleos o rendimento em óleo bruto ( $Y_{BS}$ , g OE / g bs), o teor de TA (%), o rendimento em termos de pureza de óleo em TA ( $Y_{BS}TA$ , g TA / g bs) do OE e índice de refração.

### 3.3.5 Determinação do teor de compostos antioxidantes

Nove condições de hidrodestilação (HD) de óleos essenciais (OE) de anis-estrelado (*Illicium verum* Hook), foram aplicadas, conforme planejamento experimental fatorial fracionado  $2^{4-1}$  somado a três pontos centrais (TABELA 3).

Os reagentes utilizados para as análises foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO., EUA): ABTS (CAS 30931-67-0, [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico]), ácido gálico (CAS 149-91-7, 97.5%), DPPH (CAS 1898-66-4, 2,2-difenil-1-picrilhidrazila), reagente de Folin-Ciocalteu, Trolox (CAS 53188-07-1, 6-

hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2- ácido carboxílico) e TPTZ (CAS 3682-35-7, [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina]).

A determinação dos compostos antioxidantes do padrão de trans-anetol (TA) (CAS 4180-23-8, EASTMAN CHEMICAL COMPANY®), do padrão de D-limoneno (CAS 5989-27-5, Sigma-Aldrich®) e das amostras de OE obtidas por HD foi realizada pelas metodologias CFT, DPPH, FRAP e ABTS. Estes testes ocorreram em microplaca de poliestireno com 96 cavidades de fundo chato (CORNING®), destinando-se 6 micropoços para cada amostra (6 replicatas), e leituras espectrofotométricas realizadas em equipamento *Multi-Detection Microplate Reader Synergy* HT (BIOTEK®). O planejamento experimental fatorial fracionado  $2^{4-1}$ , a análise de variância (ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ) e coeficiente de determinação para o planejamento fatorial fracionado ( $R_{\text{modelo}}^2$ ) em cada metodologia de avaliação da capacidade antioxidante foram analisados em software STATISTICA 7® (StatSoft, Inc.). O teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) foi realizado através do suplemento *Action Stat* (Estat Camp) para Excel 2013® (Microsoft Corporation).

Para a simples comparação entre os métodos, a fim de verificar se havia correlação entre eles, utilizaram-se os resultados de todos os OEs obtidos na otimização da extração e do padrão de TA. Os dados foram plotados no programa Excel 2013® (Microsoft Corporation). Para cada comparação entre os métodos, dois a dois, foi aplicada a análise de regressão linear, com equação de linha e coeficiente de determinação ( $R_{\text{pares}}^2$ ).

O preparo das soluções utilizadas nos ensaios de compostos fenólicos totais, ABTS, DPPH e FRAP, assim como maiores detalhes das metodologias, constam no ANEXO B.

### 3.3.5.1 Pré-tratamento do OE para aplicação nos testes de capacidade antioxidante

Um pré-tratamento das amostras oleosas foi realizado para eliminar possíveis interferentes nas análises, baseado no descrito por BAIL et al. (2008), PARRY et al. (2005) e TAGHVAEI et al. (2014). Para isto, 0,25 g de óleo essencial foram pesados em microtubos (duplicatas) receberam solução metanol:água 90:10 (750  $\mu\text{L}$ ) e foram agitadas em vórtex até completa solubilização do óleo. Em seguida, houve centrifugação a 3000 rpm por 5 min (4277 xg, 5 min). O sobrenadante foi acondicionado à parte e o precipitado foi novamente adicionado de solução

metanol:água (90:10), ressuspendido e centrifugado. Este procedimento foi realizado 3 vezes para cada replicata, juntando-se os extratos finais para cada amostra e mantendo-os sob refrigeração até o momento das análises.

#### 3.3.5.2 Compostos fenólicos totais (CFT)

A determinação de CFT foi baseada em SINGLETON e ROSSI (1965). Água destilada (144 µL) foi adicionada aos poços da microplaca, seguida da amostra (12 µL). Depois, foi adicionado o reagente de Folin-Ciocalteu (15 µL) e aguardou-se 3 min para adicionar a solução 20% (m/v) de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 36 µL), sendo a placa agitada levemente para homogeneização. O conjunto foi deixado sob repouso por 60 min em ambiente escuro, com posterior leitura a 720 nm. A concentração de antioxidantes em miligrama de ácido gálico equivalente por grama de OE em massa seca (GAE/g OE) foi inferida com uso de interpolação de dados da curva de calibração, com absorbância analisada nas concentrações de 0,3 a 2,5 mg ácido gálico/mL de solução etanólica.

#### 3.3.5.3 Ensaio da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power* - FRAP)

No caso do FRAP (BENZIE e STRAIN, 1996), com leituras espectrofotométricas a 593 nm, a curva padrão foi obtida com solução aquosa de trolox, de 0,0 a 1,0 mmol/L. Para o teste, solução recém preparada de FRAP (100 mL de tampão acetato de sódio, 10 mL de solução de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ , 20 mM) e 10 mL de solução TPTZ em solução de HCl 0,05 M foi adicionada aos micropoços (300 µL), seguida de água destilada (30 µL) e de amostra (10 µL). O conjunto foi deixado em repouso no escuro por 30 min e foram realizadas as leituras. Os resultados foram expressos em mmol de capacidade antioxidante equivalente a trolox por g de OE em massa seca (TEAC/g OE).

#### 3.3.5.4 Método do radical ABTS

O método do radical ABTS (ARNAO, CANO e ACOSTA, 2001; RE et al., 1999), com leituras espectrofotométricas a 734 nm, utilizou radical ABTS preparado a partir



da reação da solução estoque de ABTS (5 mL) com a solução de persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ , 88  $\mu$ L), sendo a solução mantida em ambiente escuro por 16h. Ao término do repouso, no dia de análise, 1 mL desta solução foi diluída em álcool etílico até absorvância final de  $0,700 \pm 0,050$  nm a 734 nm. A curva padrão de trolox foi de 0,2 a 0,9 mmol/L de solução etanólica. Micropoços de teste receberam reagente ABTS (300  $\mu$ L), seguido de amostra (3  $\mu$ L). Após 6 min de repouso em ambiente escuro, as leituras foram realizadas e os resultados foram indicados em TEAC/g OE.

#### 3.3.5.5 Ensaio de sequestro dos radicais livres por 2,2-Difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

Para o teste DPPH, com leitura a 515 nm a análise aplicada baseou-se em em BRAND-WILLIAMS; CUVELIER e BERSET (1995). A curva padrão de trolox variou de 0 a 1,0 mmol/L de solução metanólica. Para o teste, solução metanólica de DPPH 0,06 mmol/L (125  $\mu$ mol/L) foi adicionada (196  $\mu$ mol) aos micropoços, seguida da amostra (5  $\mu$ mol) e deixados em repouso na ausência de luz por 30 min, com posterior leitura. Foi calculada a concentração de antioxidantes TEAC/g OE, partindo-se da curva-padrão.

### 3.4 EMULSIFICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO

Para os testes de emulsificação visando-se posterior microencapsulação, utilizou-se OE obtido por hidrodestilação, na condição ideal relatada (HD1). O alginato de sódio (NaAlg) aplicado foi da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), enquanto o emulsificante Tween 80® (T80), da Reagen (Rio de Janeiro, RJ, BR).

Foram avaliadas diferentes concentrações de OE, NaAlg, T80, velocidade da homogeneização (R) em Polytron PT 3100 D (Kinematica AG®, Suíça) e tempo de homogeneização da emulsão ( $t_e$ ), aplicando-se Planejamento Fatorial Fracionado do tipo  $2^{5-2}$  em STATISTICA 7® (StatSoft, Inc.) (TABELA 5). Os níveis de OE variaram de 1 (HASHTJIN; ABBASI, 2015) a 10% (BASAK; GUHA, 2017). NaAlg foi aplicado de 0 a 2,5% (ABANG; CHAN; PONCELET, 2012) e T80 de 1,0 (LERTSUTTHIWONG et al., 2008) a 2,0% (ZHU et al., 2013; ZÜGE et al., 2013). Sobre a agitação promovida no homogeneizador, 10.000 rpm (LUPO et al., 2014; ZÜGE et al., 2013) foi o valor utilizado como ponto central, enquanto o nível mínimo foi de 5.000 rpm (NAVARRO et al., 2016) e o máximo de 15.000 rpm, a fim de verificar novas possibilidades. As

amostras foram submetidas a agitações de 1 min (NAVARRO et al., 2016) a 2 min (KOMAICO; SASTROSUBROTO e MCCLEMENTS, 2015; LERTSUTTHIWONG et al., 2008; PENICHE et al., 2004). As emulsões foram acondicionadas em vidraria do tipo Berzelius com capacidade para 400 mL, a fim de facilitar o processo de homogeneização (mais estreito e maior altura de béquero).

TABELA 5 - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2<sup>5-2</sup> PARA TESTE DE EMULSIFICAÇÃO E ESTABILIDADE.

	OE (%) <sup>1</sup>	NaAlg (%) <sup>2</sup>	T80 (%) <sup>3</sup>	R (rpm) <sup>4</sup>	t <sub>e</sub> (min) <sup>5</sup>
<b>E1</b>	1,00 (-1)	0,00 (-1)	1,00 (-1)	15.000 (+1)	2,0 (+1)
<b>E2</b>	10,00 (+1)	0,00 (-1)	1,00 (-1)	5.000 (-1)	1,0 (-1)
<b>E3</b>	1,00 (-1)	2,50 (+1)	1,00 (-1)	5.000 (-1)	2,0 (+1)
<b>E4</b>	10,00 (+1)	2,50 (+1)	1,00 (-1)	15.000 (+1)	1,0 (-1)
<b>E5</b>	1,00 (-1)	0,00 (-1)	2,00 (+1)	15.000 (+1)	1,0 (-1)
<b>E6</b>	10,00 (+1)	0,00 (-1)	2,00 (+1)	5.000 (-1)	2,0 (+1)
<b>E7</b>	1,00 (-1)	2,50 (+1)	2,00 (+1)	5.000 (-1)	1,0 (-1)
<b>E8</b>	10,00 (+1)	2,50 (+1)	2,00 (+1)	15.000 (+1)	2,0 (+1)
<b>EC (i)</b> <sup>6</sup>	5,50 (0)	1,25 (0)	1,50 (0)	10.000 (0)	1,5 (0)

<sup>1</sup>Teor de óleo essencial de anis-estrelado. <sup>2</sup>Alginato de sódio. <sup>3</sup>Emulsificante Tween 80. <sup>4</sup>Rotação de emulsificação no homogeneizador. <sup>5</sup>Tempo de emulsificação. <sup>6</sup>Ponto central, em triplicata, i = 1-3.

A estas emulsões foram aplicadas análises microscópicas, distribuição do tamanho de gota, estabilidade e comportamento reológico.

#### 3.4.1 Análise microscópica e Distribuição do Tamanho de Gota

A análise de microscopia ótica foi realizada utilizando um microscópio invertido Zeiss Observer D1 (ZEISS VISION GMBH®, Alemanha), com captura de imagem em *software* Axio Vision, versão 4.8.1. A análise ocorreu de acordo com Züge et al. (2013), com a realização de três micrografias para cada tratamento em aproximação de 160x.

#### 3.4.2 Estabilidade

As emulsões foram verificadas quanto à estabilidade por análise visual da separação de fases. Imediatamente após o preparo, alíquotas de 10 mL de material foram acondicionadas em tubos de centrífuga cônicos graduados (ZÜGE et al., 2013), em triplicatas para cada condição e mantidas sob temperatura controlada de 25°C (Estufa de Cultura Bacteriológica Q316m, QUIMIS®, Brasil). O volume da fase



separada foi verificado de 30 em 30 minutos até o tempo de 3 h após o preparo, após 12 h e depois de 24 h em 24 h até o sétimo dia (KOMAIKO; SASTROSUBROTO; MCCLEMENTS, 2015). O índice de cremeação (IC, %) (FERNANDES et al., 2017; FERNANDES et al., 2016; SILVA; MEIRELES, 2015), foi calculado pela Equação 4:

$$IC (\%) = \left(\frac{H_s}{H_t}\right) \times 100 \quad (4)$$

Onde:

$H_t$  = altura total da emulsão inicial (mL).

$H_s$  = altura da fase superior após tempo final (mL).

Teste de análise de variância (ANOVA) e Tukey foram aplicados com nível de significância de 95% ( $\alpha=0,05$ ), usando-se *Action Stat* (Estat Camp) suplemento para Excel® (Microsoft Corporation).

### 3.4.3 Comportamento reológico

A obtenção de dados reológicos das emulsões contendo OE (TABELA 5) ocorreu em triplicatas para cada condição, via viscosímetro Brookfield, modelo DV-II+Pro (Brookfield Engineering Laboratories®, EUA), com geometria de cilindro concêntrico com spindle SC4-18. O conjunto foi acoplado a banho termostático T-184 (TECNAL®, Brasil) a 25°C e utilizou-se *software* Rheocalc V3.2. As curvas de fluxo e de viscosidade, assim como o ajuste dos modelos da Lei da Potência e de Bingham (Equações 1 e 2 do item 2.6) aos dados obtidos, foram avaliados no programa OriginPro® 8.6.

A fim de avaliar a consistência entre dados experimentais e os resultados previstos, verificaram-se os ajustes  $R^2$  e a soma dos quadrados dos resíduos (SQR, Equação 5) (DONG et al., 2014;. JOKIC et al., 2010; ZUGE, 2015).

$$SQR = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left[ (y_{calc} - y_{exp})^2 \right]} \quad (5)$$

Onde:

$n$  = Número de pontos analisados no experimento;

$y_{calc}$  = Valores calculados de acordo com o modelo aplicado;

$y_{exp}$  = Valores experimentais obtidos.

Com tais dados, determinou-se a adequação dos modelos matemáticos propostos a cada emulsão preparada.

#### 3.4.4 Tensão superficial da emulsão

No intuito de verificar se a condição indicada para adição de T80 no planejamento experimental de emulsões condizia com alteração na tensão superficial, foi utilizado tensiômetro (K100 *Tensiometer*, KRUSS®, Alemanha) aplicando-se método do anel Du Nouy (*spindle* RI 01) a 25°C (RAJABI et al., 2015). As concentrações de T80 na condição E6m foram inicialmente aumentadas de 0,4 em 0,4% (m/v) e depois de 0,1 em 0,1% no intervalo de 0,0 a 0,4% (m/v). Médias de cinco dados foram obtidas para cada ponto de análise.

### 3.5 MICROENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO

#### 3.5.1 Testes com emulsões contendo alginato de sódio

As condições preliminares testadas para microencapsulação (TABELA 6) foram as dos testes do planejamento experimental fracionado 2<sup>5-2</sup> contendo alginato de sódio (E3, E4, E7, E8 e ponto central - EC), assim como solução de alginato de sódio (NaAlg,s, 2,5% m/v), a condição de maior estabilidade contendo 10% (m/v) de óleo essencial, com modificação para adição de 2,5% (m/v) de NaAlg (condição E6m) e também a condição de emulsão considerada mais estável (EI).

TABELA 6 – TESTES PRELIMINARES PARA MICROENCAPSULAÇÃO.

Condições	OE (%) <sup>1</sup>	NaAlg (%) <sup>2</sup>	T80 (%) <sup>3</sup>	R (rpm) <sup>4</sup>	t <sub>e</sub> (min) <sup>5</sup>
E3	1,00	2,50	1,00	5.000	2,0
E4	10,00	2,50	1,00	15.000	1,0
E7	1,00	2,50	2,00	5.000	1,0
E8	10,00	2,50	2,00	15.000	2,0
EC	5,50	1,25	1,50	10.000	1,5
E6m <sup>6</sup>	10,00	2,50 <sup>1</sup>	2,00	5.000	2,0
EI	2,00	0,40	2,00	5.000	1,5
NaAlg,s	-	2,50	-	10.000	2,0

<sup>1</sup>Teor de óleo essencial de anis-estrelado. <sup>2</sup>Alginato de sódio. <sup>3</sup>Emulsificante Tween 80. <sup>4</sup>Rotação de emulsificação no homogeneizador. <sup>5</sup>Tempo de emulsificação.

<sup>6</sup>E6m = Condição E6 modificada

As emulsões foram preparadas em homogeneizador Polytron PT 3100 D (KINEMATICA AG®, Suíça) e imediatamente levadas ao processo de microencapsulação.

As amostras foram acondicionadas em seringa de polipropileno acoplada a agulha 22G x 1 1/4" (BD PrecisionGlide™). A altura do gotejamento sob a solução salina de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ , 2,5% m/v, Cloreto de cálcio anidro, CAS 100-43-52-4, Alphatec®, Brasil) foi de 15 cm (OTÁLORA et al, 2016), o tempo de permanência no  $\text{CaCl}_2$  ( $t_p$ ) em 10 min (ABANG; CHAN e PONCELET, 2012) e a quantidade foi fixada em 100 esferas para 50 mL de solução salina de  $\text{CaCl}_2$  (2,5%), em béquer de 200 mL, sendo que o sistema foi agitado suavemente em agitador magnético (752A, FISATOM®, Brasil) (FIGURA 22).

FIGURA 22 – MICROENCAPSULAÇÃO DO OE UTILIZANDO SERINGA.



FONTE: A autora (2019).

Após o tempo de permanência, as microcápsulas foram vertidas em peneira, enxaguadas rapidamente com água destilada (OTÁLORA et al, 2016) e a umidade superficial foi removida por rápido contato com papel filtro. Para todas as condições, foram analisadas também as partículas secas sob temperatura ambiente ( $25,0 \pm 1,1^\circ\text{C}$ ) por 24 h em estufa de cultura bacteriológica (Q316m, QUIMIS®, Brasil) contendo sílica (aproximadamente 150 g).

As massas de 10 esferas úmidas ( $m_u$ ) e secas ( $m_s$ ) foram aferidas em balança analítica, enquanto os diâmetros médios (D) foram determinados em microscópio invertido Zeiss Observer D1 (ZEISS VISION GMBH®, Alemanha) (LIU; XU e WANG, 2012), com captura de imagem em *software* AxioVision, versão 4.8.1, com aproximação de imagem a 50x. O teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) foi realizado através do suplemento *Action Stat* (Estat Camp) para Excel 2013® (Microsoft Corporation).

As condições das análises termogravimétricas para microcápsulas úmidas e secas, T80, NaAlg e emulsão E6m foram aplicadas de acordo com o item 3.3.2, porém adicionando-se esferas de 5 até 11 mg.

### 3.5.2 Otimização da microencapsulação

A partir dos dados obtidos nos testes preliminares de microencapsulação, foi aplicado Delineamento composto central rotacional (DCCR) para determinar o ponto ótimo de microencapsulação da emulsão E6m. Foram variados os parâmetros: concentração de  $\text{CaCl}_2$  na solução de 1,5% (m/V) (LIU; XU e WANG, 2012) a 2,5% (m/v) (CALVO; BUSCH; SANTAGAPITA, 2017; LIU; XU e WANG, 2012; YAN et al., 2014) e tempo de permanência no  $\text{CaCl}_2$  ( $t_p$ ), de 1 min (OTÁLORA et al., 2016) a tempos de até 30 min (ABANG; CHAN e PONCELET, 2012; CALVO; BUSCH; SANTAGAPITA, 2017; LIU; XU e WANG, 2012) (TABELA 7).

TABELA 7 – ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DO PONTO ÓTIMO DE MICROENCAPSULAÇÃO A PARTIR DE PLANEJAMENTO DCCR.

Ensaio	$\text{CaCl}_2$ (%) <sup>1</sup>	$t_p$ (min) <sup>2</sup>
Enc.1	1,5	1,0
Enc. 2	1,5	30,0
Enc. 3	2,5	1,0
Enc.4	2,5	30,0
Enc.5	1,2929	15,5
Enc.6	2,7071	15,5
Enc.7	2,0	-5,0061 <sup>4</sup>
Enc.8	2,0	36,0061 <sup>5</sup>
Enc.C (i) <sup>3</sup>	2,0	15,5

<sup>1</sup>Cloreto de cálcio adicionado à solução salina de maturação. <sup>2</sup>Tempo de permanência/maturação das microcápsulas na solução salina. <sup>3</sup>Ponto central, em duplicata, i = 1-2. <sup>4</sup>Considerado como zero min.

<sup>5</sup>Arredondado para 36 min.

O ponto Enc. 7, por ter seu tempo “negativo”, não foi realizado, uma vez que teoricamente não havendo tempo para maturação da emulsão na solução salina, obviamente não haveria solidificação e formação de microcápsula.

Como variável de resposta, foi verificada a eficiência da encapsulação (EE, %), baseada em Fernandes et al. (2016), com modificações da massa (calculada para permitir concentração cromatográfica ideal de quantificação de trans-anetol, de até 0,1 mg TA/mL, BHADRA et al., 2011). Foram pesadas aproximadamente 25 mg de microcápsulas em tubos Falcon (Centrifuge Tubes K19-0015, KASVI®) contendo 10 mL de metanol. O conjunto foi submetido a banho ultrassônico (SoniClean 6, SANDERS MEDICAL®, Brasil) a 500 W de potência nominal por 10 min. Ao término do tempo, alíquotas de 1,5 mL, em triplicatas, foram submetidas a GC-MS para quantificação de trans-anetol (metodologia descrita no item 3.3.3).

A eficiência de encapsulação foi definida como a quantidade de óleo recuperada por grama de microcápsula em relação ao óleo inicialmente adicionado à emulsão (FERNANDES et al., 2016; GONSALVES et al., 2009) e a melhor condição foi utilizada como ponto ótimo de microencapsulação.

Como análise complementar, foram determinados os diâmetros médios, em  $\mu\text{m}$ , utilizando microscópio invertido, do mesmo modo que descrito no item 3.5.1. O teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) foi realizado através do suplemento *Action Stat* (Estat Camp) para Excel 2013® (Microsoft Corporation).

### 3.6 ANÁLISES DAS PARTÍCULAS FORMADAS

A condição no ponto ótimo de microencapsulação (10% OE, 2,5% NaAlg, 2,0% T80, 5.000 rpm/2 min, imersão em solução de 2,0% de  $\text{CaCl}_2$  por 15,5 min) foi destinada a testes de secagem, morfologia e análise termogravimétrica.

#### 3.6.1 Testes de secagem

As microcápsulas foram desidratadas à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,3^\circ\text{C}$ , código  $S_{25^\circ\text{C}}$ ) por 24 h em estufa de cultura bacteriológica (Q316m, QUIMIS®, Brasil) contendo sílica (aproximadamente 150 g). Com o mesmo equipamento foram aplicadas as temperaturas de  $42,5^\circ\text{C}/24\text{ h}$  ( $S_{42,5^\circ\text{C}}$ ) e  $60^\circ\text{C}/24\text{ h}$  ( $S_{60^\circ\text{C}}$ ). Amostras do ponto ótimo foram também liofilizadas (DELADINO et al., 2008) por 48 h em

equipamento Liofilizador (L101, LIOTOP®, Brasil) ( $S_{Lio}$ ). Foi verificada a redução de massa das amostras (%), em triplicatas contendo 250 mg de microcápsulas cada, e aplicado teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) através do suplemento *Action Stat* (Estat Camp) para Excel 2013® (Microsoft Corporation).

### 3.6.2 Morfologia das microcápsulas úmidas e secas

As microcápsulas úmidas (imediatamente após preparo), as secas à 25°C, 42,5°C, 60°C e liofilizadas foram analisadas morfológicamente por microscopia invertida. As desidratadas foram visualizadas também por microscopia eletrônica de varredura.

#### 3.6.2.1 Microscopia invertida – diâmetro médio das microcápsulas

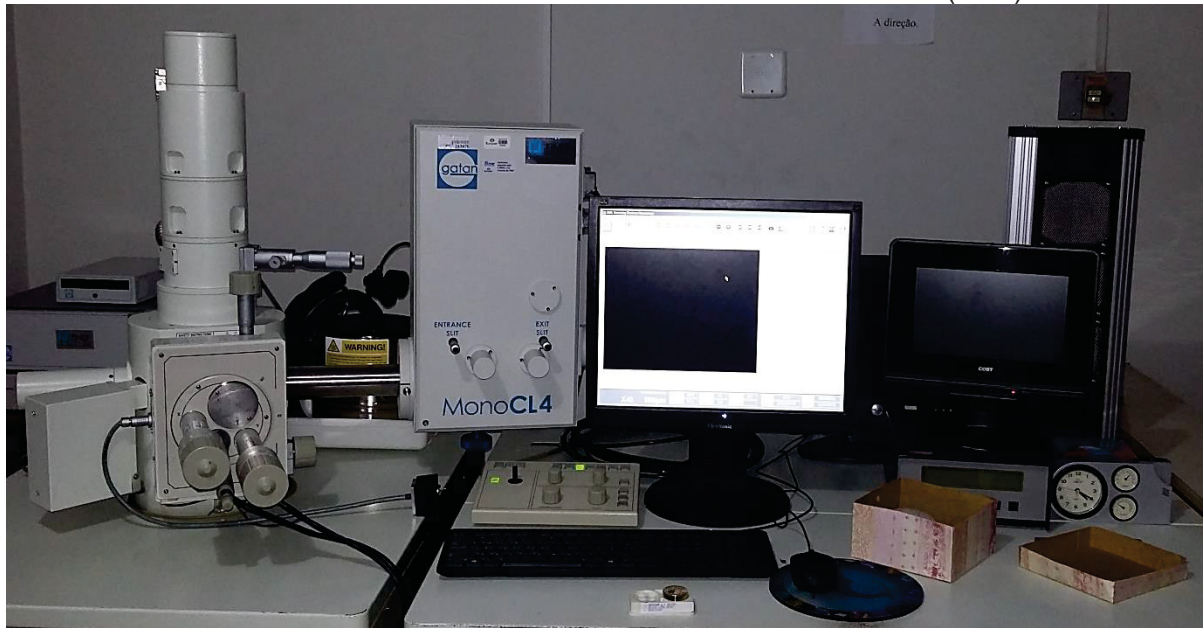
A microscopia invertida foi aplicada tal como descrito no item 3.5.1, no intuito de verificar o tamanho e formato das partículas formadas (LIU; XU e WANG, 2012).

#### 3.6.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia por Microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi realizada em MonoCL4 (FIGURA 23, GATAN®, EUA), operando a 15 kV. Antes da análise, as amostras desidratadas foram revestidas com ouro via pulverização em metalizadora SCD 030 (FIGURA 24, BALZERS UNION®, Liechtenstein), com dispersão de corrente de 30 mA e utilizando gás argônio sob vácuo 0,1 Pa, durante 1,5 min. As imagens foram capturadas com ampliações de 45x, 85x, 500x, 2000x e 3000x.

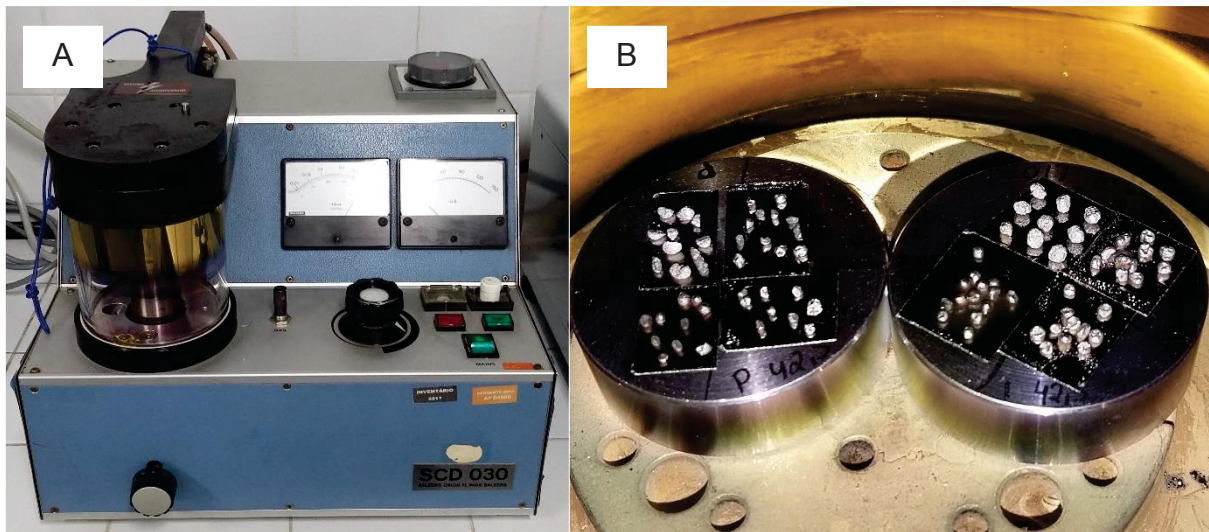


FIGURA 23 – MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV).



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 24 – PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO DAS MICROESTRUTURAS POR MEV.



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: (A) Metalizadora;  
(B) Amostras revestidas com ouro.

A análise das amostras no MEV permite verificar a integridade do revestimento de alginato (película sem formação de cavidades/poros), uma vez que evita a perda de composto bioativo volátil e sua oxidação durante armazenamento (DELADINO et al., 2008).

### 3.7 CINÉTICA DA LIBERAÇÃO DE TRANS-ANETOL EM AMBIENTE DE pH GASTROINTESTINAL – TESTE *IN VITRO*

As microcápsulas obtidas na melhor condição de microencapsulação (10% OE, 2,5% NaAlg, 2,0% T80, 5.000 rpm/2 min, imersão em solução de 2,0% de  $\text{CaCl}_2$  por 15,5 min, desidratadas a 25°C por 24 h em estufa bacteriológica contendo sílica) foram destinadas à cinética de liberação em meio simulando acidez do suco gástrico (pH 1,2, sem enzimas) e do fluido intestinal (tampão fosfato, pH 6,8, sem enzimas) (WANG et al., 2016), no intuito de verificar em qual condição haveria maior perfil de liberação. Estes meios simulados seguiram as recomendações de preparo pela Farmacopeia Brasileira (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2010), também condizentes com a Farmacopeia dos Estados Unidos (*The United States Pharmacopeia* - USP) e com a Farmacopeia internacional (*The International Pharmacopoeia* - IntPh) (STIPPLER; KOPP; DRESSMAN, 2004).

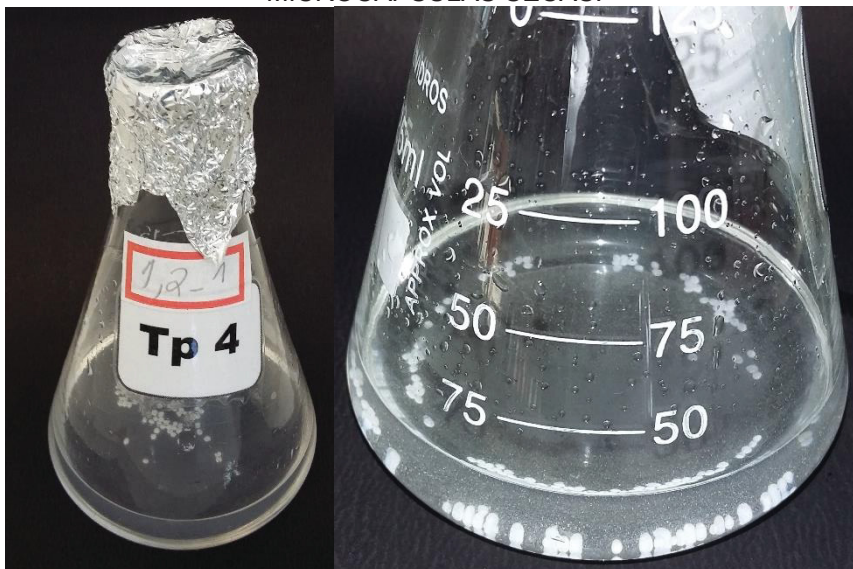
Para o fluido gástrico simulado (sem enzima), foram dissolvidos 0,5 g de cloreto de sódio (NaCl P.A., SINTH®) em 50 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 1,75 mL de ácido clorídrico (HCl P.A., ALPHATEC®). Completou-se o volume para 250 mL com água destilada e o pH foi ajustado para  $1,2 \pm 0,1$  com hidróxido de sódio 0,2 N (2 g NaOH, NUCLEAR®, para 250 mL de solução com água destilada) e com HCl 0,2 N (4 mL de HCl para 250 mL de solução com água destilada).

O fluido intestinal simulado (sem enzima) foi preparado dissolvendo-se 1,7013 g de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NUCLEAR®) e 0,2240 g de hidróxido de sódio (NaOH, NUCLEAR®) em água destilada para volume final de 250 mL.

Foram pesados 400 mg de amostras secas para 30 mL de solução. Para cada pH, foram preparadas duplicatas de Erlenmeyers (capacidade para 50 mL), contendo as microcápsulas e 30 mL de solução (FIGURA 25). O conjunto foi incubado a  $37,0 \pm 1,6^\circ\text{C}$  sob agitação contínua (100 rpm), em Incubadora Refrigerada com Agitação (TE-42I, TECNAL®, Brasil), havendo amostragem nos intervalos de 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min (WANG et al., 2016), tempos superiores aos quais partículas sólidas costumam transitar em ambiente gastrointestinal, de uma hora e trinta e cinco minutos (1h35min) para ambiente estomacal e de três horas e cinquenta e cinco minutos (3h55min), para intestinal (GRAFT; BRINCH; MADSEN, 2001).



FIGURA 25 - ASPECTO VISUAL INICIAL DA REPLICATA 1 DO pH 1,2 CONTENDO 400 mg DE MICROCÁPSULAS SECAS.



FONTE: A autora (2019).

As alíquotas retiradas para cada replicata em cada tempo foram de 100  $\mu$ L, totalizando 800  $\mu$ L, ou seja, aproximadamente 2,7% do total volumétrico. Destas alíquotas, 20  $\mu$ L foram adicionados de 1000  $\mu$ L de etanol P.A (CAS 64-17-5, 99,5% P.A., NEON®) e destinados a análise em equipamento espectrofotométrico (UV-1800, SHIMADZU®, JAPÃO), com verificação de comprimento de onda em modo varredura para a faixa de 200-800 nm, sendo comprovado o comprimento de onda de 258 nm a faixa de leitura reconhecida para trans-anetol (COLUSSO, 2016; PUBCHEM, 2019). O cálculo da concentração de TA liberado baseou-se na curva-padrão preparada nas concentrações de 5 a  $9 \cdot 10^{-3}$  mg/mL, em etanol P.A (CAS 64-17-5, 99,5% P.A., NEON®), e nas diluições realizadas.

Com a concentração de TA liberada para 1h35min em ambiente estomacal e de 3h55min para intestinal, e sabendo-se o valor diário limite para ingestão de 2 mg/kg de massa corporal (*The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA*, 1998; WHO/IPCS\_INCHEM, 2018), foi estimada a quantidade máxima diária de microcápsulas a serem ingeridas por pessoas de 60 e 80 kg, respectivamente.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL DE ANIS-ESTRELADO

O anis-estrelado chinês desidratado utilizado neste estudo era composto por 6-8 folículos (FIGURA 26), de coloração marrom, cada um medindo pelo menos 10 mm, condizente com amostra comestível (CHEMPAKAM e BALAJI, 2008; WANG et al., 2011).

FIGURA 26 – ASPECTO VISUAL DO ANIS-ESTRELADO CHINÊS COMERCIAL.



FONTE: A autora (2019).

Os resultados para granulometria, umidade e atividade de água são reportados a seguir.

#### 4.1.1 Testes granulométricos

A grande maioria ( $99,14\% \pm 0,14\%$ ) dos frutos de anis-estrelado continham partículas maiores que  $2360 \mu\text{m}$  (TABELA 8), indicando integridade das amostras comerciais e a possível necessidade de moagem para os testes de extração do óleo essencial.

TABELA 8 – TESTE GRANULOMÉTRICO NA AMOSTRA COMERCIAL INTEGRAL DE ANIS-ESTRELADO.

Abertura (µm)	Diâmetro médio (µm)	Re (%) <sup>1</sup>
Fundo	425	0,0962 ± 0,0151
850	1015	0,2124 ± 0,0170
1180	1290	0,0730 ± 0,0042
1400	1700	0,2323 ± 0,0235
2000	2180	0,1427 ± 0,0039
2360	> 2360	99,1405 ± 0,1384

<sup>1</sup>Fração de massa retida.

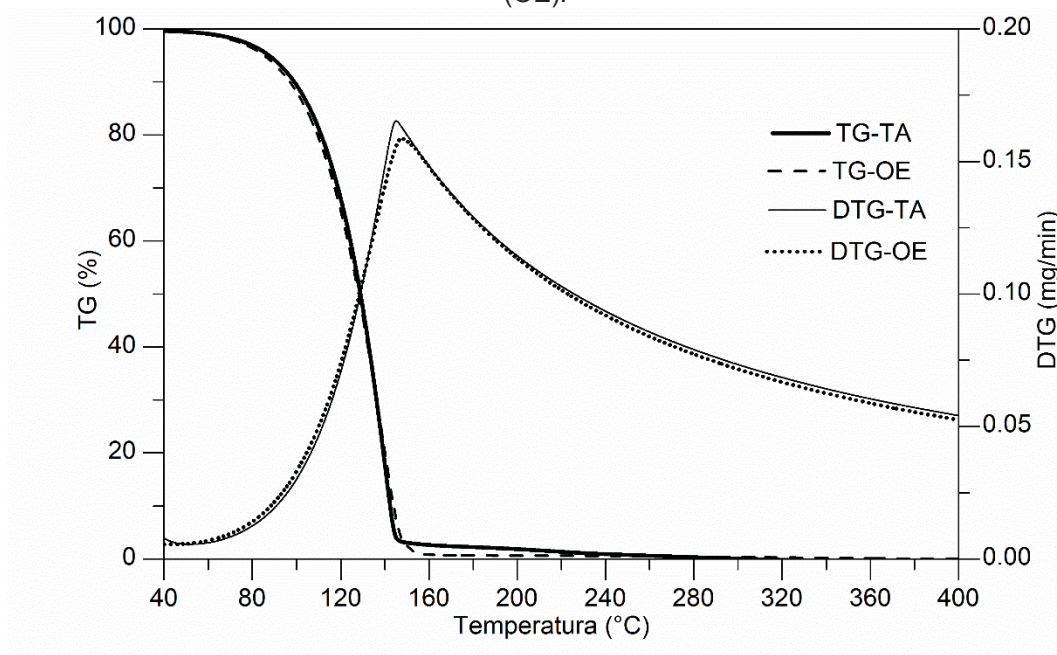
#### 4.1.2 Umidade dos frutos triturados e relação com perfil térmico do óleo essencial e do padrão de trans-anetol

O método de secagem tradicional (estufa a 105 ° C) apresentou um teor de umidade mais elevado nas amostras trituradas ( $16,55 \pm 0,33\%$ , m/m) do que o relatado anteriormente, de 8-12% (CHEMPAKAM e BALAJI, 2008), 8,59% (WANG; JIANG e WEN, 2007) e 14,9% (ZHAI et al., 2009). Essa diferença pode ser explicada pela variação biológica entre os espécimes ou pelo erro atribuído à metodologia. Além da desidratação convencional, a umidade também foi avaliada por secagem por infravermelho, a 60 e 105°C.

Embora os resultados de umidade dependam da técnica utilizada (teste de Tukey,  $\alpha=0,05$ , todas as condições diferiram entre si), foram observadas baixas dispersões (desvio padrão). O maior teor de umidade foi observado para a estufa de secagem a 105°C ( $16,55 \pm 0,33\%$ , m/m), seguido de secagem por infravermelho a 105°C ( $14,63 \pm 0,33\%$  m/m) e a 60°C ( $12,98 \pm 0,14\%$ , m/m). Este fenômeno pode ser atribuído à perda de materiais voláteis, e não somente de água.

As curvas TG e DTG do OE a partir de frutos de anis-estrelado triturado (20 g, 20 s) e do padrão TA (FIGURA 27) reforçaram essa hipótese. A perda de massa exibiu comportamento semelhante para OE (0,788%) e TA (0,536%) entre 40°C e 60°C. Da mesma forma, 13,8% de TA e 15,5% de OE foram degradados de 40 a 105°C. Em outras palavras, há uma perda relevante de componentes de OE quando temperaturas mais altas de secagem são usadas. Portanto, a avaliação da umidade deve ser realizada a uma temperatura baixa para evitar superestimar o teor de água (por exemplo, deve ser realizada a 60°C usando o método de infravermelho).

FIGURA 27 - CURVAS DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG) E SUAS DERIVADAS (DTG) PARA O PADRÃO TRANS-ANETOL (TA) E PARA O ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO (OE).



Um valor de umidade de 12,98% foi usado para calcular o rendimento do óleo de base seca. O pico de perda de massa do padrão TA (145,1°C) foi muito semelhante ao do OE (147,7°C). A massa residual também foi muito semelhante, 4,1% e 3,8%, respectivamente: uma diferença de 7,3%. Estes resultados sugerem que o OE tem um alto conteúdo de TA, que tem sido descrito em torno de 70-94% (CHOUKSEY; UPMANYU e PAWAR, 2013; HERRERA, 2009).

#### 4.1.3 Atividade de água

A maioria das bactérias halofílicas e o fungos micotoxigênicos se desenvolvem em atividade de água entre 0,75 e 0,80 (DAMODARAN; PARKIN e FENNEMA, 2008; TAPIA; ALZAMORA; CHIRIFE, 2007). Para o anis-estrelado (20g, 20 s), o seu valor foi de 0,7853 ( $\pm 0,0062$ ). Assim, sugere-se que o produto seja armazenado a baixas temperaturas até o seu processamento.

#### 4.1.4 Testes de moagem

A fim de se verificar o comportamento da moagem variando tempo e massa para os experimentos, foram obtidos os valores de amostra retida (Re, %) e de fração acumulada (Ac, %) (TABELA 9).

TABELA 9 – FRAÇÕES RETIDAS (Re, %) E ACUMULADAS (Ac, %) NOS ENSAIOS DE MOAGEM.

Testes <sup>1</sup>	8s,15g (M5)	10s,10g (M1)	10s,20g (M2)	15s,8g (M7)	15s, 15g (MC)	15s,22g (M8)	20s,10g (M3)	20s,20g (M4)	22s,15g (M6)
D <sub>m</sub> (μm) <sup>2</sup>	Re (%)								
75	0,4±0,0	1,4±0,0	0,7±0,1	0,3±0,1	0,2±0,0	0,2±0,1	2,1±0,1	0,8±0,1	0,6±0,0
225	2,7±0,0	6,7±0,1	3,6±0,0	2,4±0,0	3,5±0,0	3,0±0,1	9,7±0,4	6,5±0,5	6,0±0,0
362,5	5,7±0,0	5,0±0,1	7,0±0,0	11,4±0,1	3,2±0,0	10,1±0,1	7,7±0,3	11,4±0,1	12,1±0,0
512,5	6,0±0,0	9,1±0,1	5,5±0,0	10,9±0,0	2,3±0,0	6,7±0,1	10,0±0,4	9,8±0,0	9,3±0,1
725	14,5±0,0	15,5±0,0	14,9±0,1	24,3±0,0	12,4±0,0	22,9±0,0	27,2±0,1	25,6±0,3	29,9±0,0
1015	8,4±0,0	9,3±0,0	7,2±0,0	15,2±0,0	20,3±0,0	10,8±0,2	11,2±0,1	10,4±0,0	12,8±0,0
1290	5,2±0,0	8,1±0,1	6,2±0,0	6,7±0,0	18,3±0,0	6,0±0,0	7,5±0,3	7,4±0,1	6,7±0,0
1700	15,3±0,0	18,2±0,0	15,5±0,1	17,1±0,1	14,7±0,0	15,2±0,0	15,8±0,3	14,5±0,2	14,7±0,0
2180	8,7±0,0	7,8±0,1	8,8±0,1	6,0±0,1	7,7±0,0	8,4±0,2	5,4±0,2	5,4±0,0	3,6±0,0
> 2360	33,2±0,0	18,8±0,0	30,5±0,1	5,6±0,1	17,3±0,0	16,7±0,1	3,4±0,6	8,4±0,0	4,3±0,1
D <sub>m</sub> (μm) <sup>2</sup>	Ac (%)								
75	0,4±0,0	1,4±0,0	0,7±0,1	0,3±0,1	0,2±0,0	0,2±0,1	2,1±0,1	0,8±0,1	0,6±0,0
225	3,2±0,0	8,2±0,1	4,2±0,0	2,7±0,1	3,7±0,0	3,2±0,2	11,8±0,5	7,3±0,6	6,6±0,0
362,5	8,8±0,0	13,1±0,2	11,3±0,0	14,2±0,0	6,9±0,0	13,2±0,2	19,5±0,8	18,6±0,6	18,7±0,0
512,5	14,8±0,0	22,3±0,1	16,8±0,0	25,0±0,0	9,2±0,0	20,0±0,3	29,5±1,2	28,4±0,5	28,0±0,0
725	29,2±0,1	37,8±0,1	31,8±0,1	49,3±0,0	21,7±0,0	42,9±0,3	56,8±1,3	54,0±0,3	57,9±0,1
1015	37,7±0,0	47,1±0,1	38,9±0,1	64,5±0,0	42,0±0,0	53,7±0,1	67,9±1,5	64,4±0,2	70,6±0,1
1290	42,8±0,0	55,2±0,0	45,1±0,1	71,2±0,0	60,2±0,1	59,8±0,1	75,4±1,2	71,8±0,2	77,4±0,0
1700	58,1±0,0	73,4±0,0	60,7±0,0	88,4±0,1	75,0±0,1	74,9±0,1	91,2±0,9	86,2±0,0	92,1±0,1
2180	66,8±0,0	81,2±0,0	69,5±0,1	94,4±0,1	82,7±0,0	83,3±0,1	96,6±0,6	91,6±0,0	95,7±0,1
> 2360	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0

<sup>1</sup> Condições em ordem crescente de massas e tempos de moagem (t<sub>m</sub>) <sup>2</sup> Diâmetro médio.

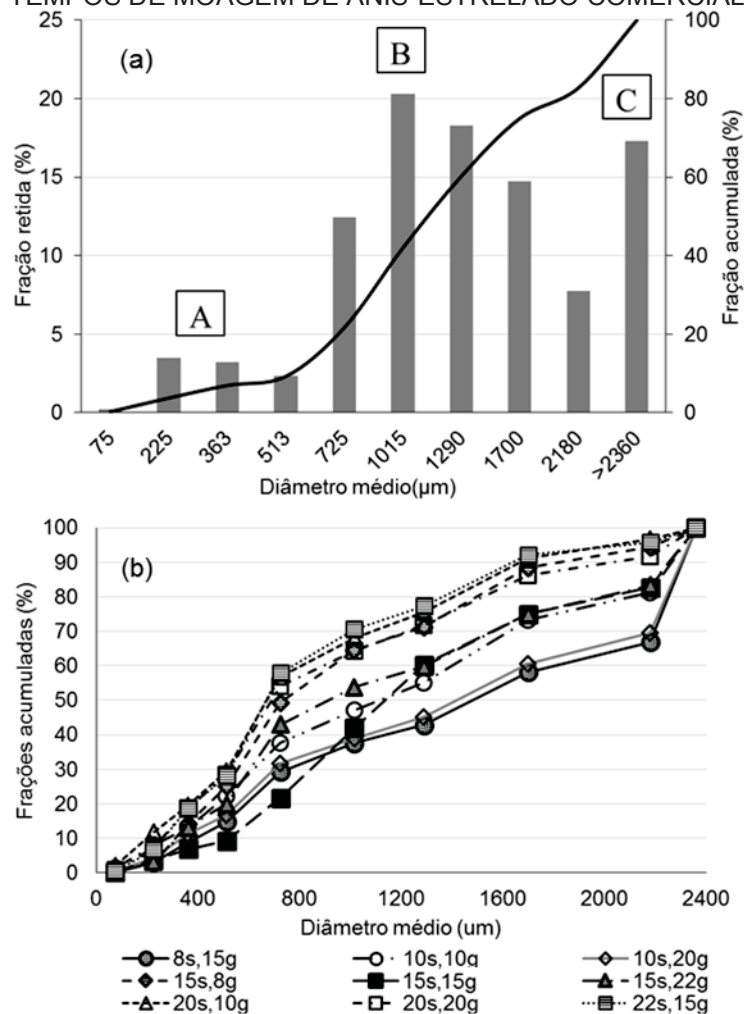
Verificou-se que o anis-estrelado desidratado não é um material isotrópico, assim como observado visualmente (FIGURA 28) sugerido pela curva de moagem cumulativa (FIGURA 29, a). Existem três frações distintas de susceptibilidade a fragmentação, uma produzindo uma fração fina (indicada por A), outra produzindo uma fração intermediária (B) e outra produzindo uma fração grossa (C). A primeira pode estar associada às partes mais frágeis do fruto, enquanto a segunda consiste principalmente de sementes (FIGURA 29, a), que não são a fonte de óleo (CHEMPAKAM e BALAJI, 2008; LI et al., 2010; WANG et al., 2011). Portanto, esta fração de sementes pode ser separada para evitar a introdução de material desnecessário no sistema de hidrodestilação e para destinar o material à produção de ácido xiquímico, presente nas sementes e que é o ingrediente primário usado para fabricar o medicamento antiviral Tamiflu® (fosfato de oseltamivir), que combate a gripe aviária H5N1 (WANG et al., 2011).



FIGURA 28 – ASPECTO VISUAL DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA MOAGEM DE ANIS-ESTRELA DO.



FIGURA 29 - (a) PERFIL MÉDIO DAS FRAÇÕES DE FRUTOS COMERCIAIS SUJEITAS À FRAGMENTAÇÃO (15 s, 15 g); (b) FRAÇÕES ACUMULADAS PARA DIFERENTES MASSAS E TEMPOS DE MOAGEM DE ANIS-ESTRELA DO COMERCIAL.



Existe um efeito quadrático significativo ( $p < 0,050$ ) para o tempo e para a massa do fruto e um efeito linear do tempo (TABELA 10) sobre a massa retida nas peneiras de diferentes tamanhos (FIGURA 29, b). Tempos de moagem mais longos, 20s, 10g

ou 22s,15g, resultam em maiores frações acumuladas nas menores peneiras de diâmetro médio 362,5  $\mu\text{m}$  (19,48% e 18,68%, respectivamente) e 725  $\mu\text{m}$  (56,76% e 57,87%, respectivamente) do que a moagem em menores tempos, como 8s,15g e 10s,20g. Nesses casos, para os mesmos diâmetros médios, os valores foram 8,82% e 11,28% e 29,24% e 31,76%, respectivamente. A distribuição de massa no tempo de 15 s assume o comportamento intermediário (FIGURA 29, b). Tal comportamento era esperado, uma vez que quanto maior o material remanescente no equipamento de moagem, maior o grau de finura obtido.

TABELA 10- ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA,  $R^2 = 0,9507$ ) E EFEITO DO TEMPO E DA MASSA NA MOAGEM PARA OBTER UMA FRAÇÃO FINA (< 425  $\mu\text{m}$ ).

Fator	SS	df	MS	F	p	Efeito
(1) t (L)	95,6097	1	95,60974	50,71629	<b>0,002055*</b>	<b>+6,9141*</b>
t (Q)	34,2640	1	34,26405	18,17540	<b>0,013020*</b>	<b>+5,4755*</b>
(2) m (L)	2,0118	1	2,01179	1,06715	0,359953	-1,0029
m (Q)	33,7253	1	33,72529	17,88962	<b>0,013374*</b>	<b>-1,0330*</b>
t por m	0,2644	1	0,26437	0,14023	0,727057	+5,4323
Erro	7,5408	4	1,88519			0,5142
Total SS	153,0203	9				

\* Estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ).

É notória que a hidrodestilação é mais eficiente quando partículas pequenas são utilizadas, especialmente entre 60 mesh (250  $\mu\text{m}$ ) a 40 mesh (425  $\mu\text{m}$ ) (CAI et al., 2014; LI et al., 2010). Portanto, os dados foram plotados usando três intervalos de granulometria (< 425  $\mu\text{m}$ , 425 - 850  $\mu\text{m}$  e > 850  $\mu\text{m}$ ) (FIGURA 30) para avaliar os efeitos do tempo e massa e para explicar a operação.

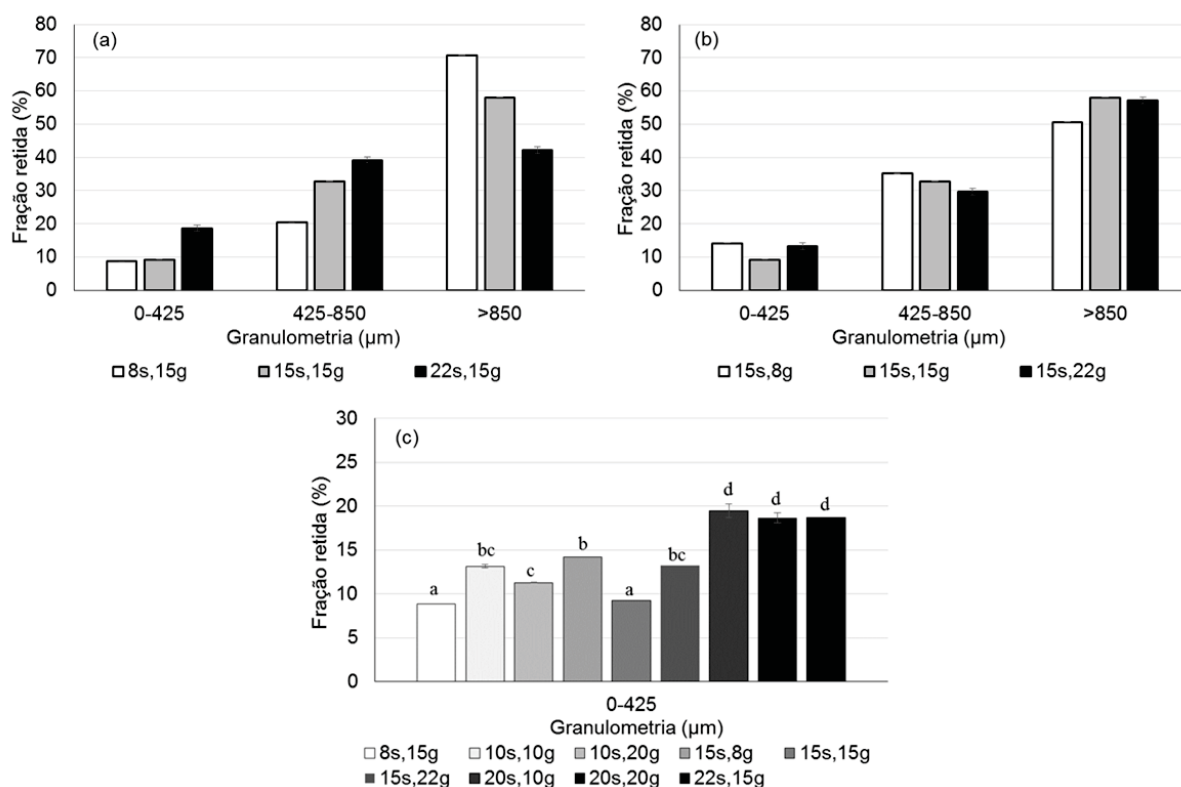
FIGURA 30 – ANÁLISE VISUAL DOS INTERVALOS DE GRANULOMETRIA UTILIZADOS NA HIDRODESTILAÇÃO.



O efeito do tempo foi facilmente observado (FIGURA 31, a), mas o mesmo não pode ser afirmado para a massa (FIGURA 31, b). Partículas menores que 425  $\mu\text{m}$  foram obtidas (FIGURA 31, c), que é a faixa recomendada para hidrodestilação (CAI et al., 2014; LI et al., 2010), foram utilizadas. As condições 8s, 15g e o ponto central

(15s, 15g) (FIGURA 31, c) não diferiram estatisticamente entre si (a mesma letra indica igualdade estatística pelo teste de Tukey;  $p \geq 0,05$ ), mas foram diferentes das demais. Nos limites do estudo, os tempos maiores (20s e 22s) permitiram o uso de uma ampla variação de massa a ser moída. Entretanto, a massa a ser triturada depende do tempo (letras b, teste de Tukey) com valores intermediários. Em geral, tempos mais altos de moagem apresentaram maior fração  $<425 \mu\text{m}$  e pequenas quantidades de amostra parecem ser favoráveis para o tempo intermediário (FIGURA 31, c).

FIGURA 31 – FRAÇÕES RETIDAS PARA DIFERENTES CONDIÇÕES DE MOAGEM.



LEGENDA: (a) Frações retidas (%) para massa fixa de 15 g e diferentes tempos de moagem;  
 (b) Frações retidas (%) para tempo fixo de 15 s com diferentes massas de moagem;  
 (c) Influência do tempo de moagem e da massa do anis-estrelado na retenção da fração de finos (0-425  $\mu\text{m}$ ).

\*Mesma letra indica igualdade estatística por teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

De acordo com a ANOVA (TABELA 10), tempo e massa são estatisticamente significativos ( $p < 0,050$ ), sendo que o rendimento da massa retida ( $Re, \%$ ) para partículas menores que  $425 \mu\text{m}$  pode ser descrito pela Equação 6, a partir da qual se pode comparar os valores previstos pelo modelo e os observados empiricamente (TABELA 11).



$$Re_{<425\ \mu m}(t, m) = 0,0623\ t^2 - 1,1765\ t - 0,0016\ m^2 + 16,3733 \quad (6)$$

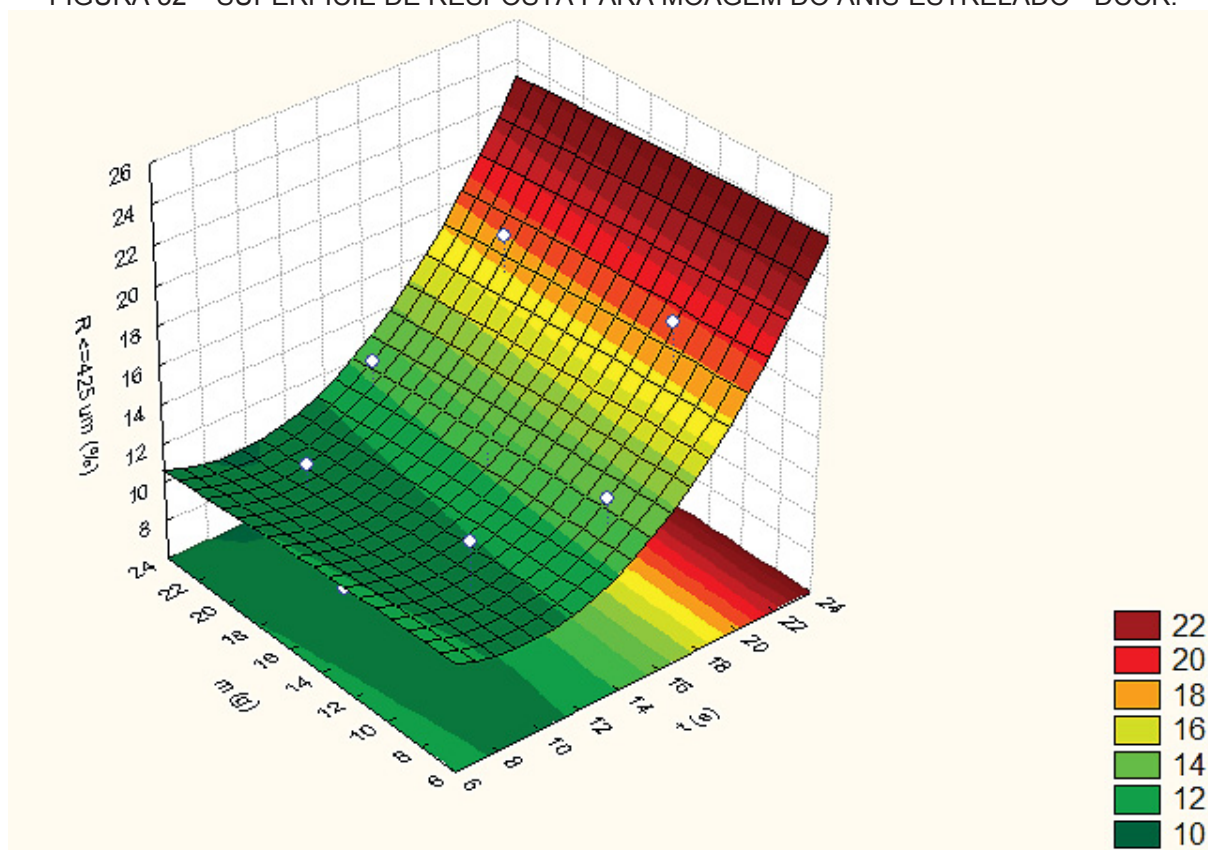
TABELA 11 - VALORES PREDITOS E OBSERVADOS PARA MOAGEM DE ANIS-ESTRELADO.

Experimentos	Valores preditos <sup>1</sup>	Valores observados	Desvio-padrão
M1	10,68	13,14	1,23
M2	10,20	11,28	0,54
M3	17,59	19,48	0,95
M4	17,11	18,64	0,77
M5	10,60	8,82	0,89
M6	20,38	18,68	0,85
M7	12,63	14,17	0,77
M8	11,96	13,24	0,64
MC (i)	12,38	9,23	1,57

<sup>1</sup>Valores preditos pelo modelo do planejamento experimental.

A superfície de resposta (FIGURA 32) ilustra que quanto maior o tempo de moagem a qual a massa de amostra é submetida, maior o rendimento da obtenção das partículas com até 425 µm, conforme o esperado.

FIGURA 32 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA MOAGEM DO ANIS-ESTRELADO - DCCR.



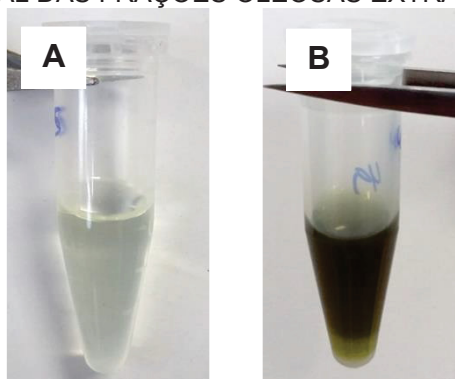
Uma quantidade padrão de amostra (20 g) e um tempo padrão de moagem (20 s) foram utilizados nos testes seguintes de extração de óleo, a fim de minimizar o aquecimento das amostras (possível perda de compostos voláteis) e evitar a trituração das sementes, que são pobres em trans-anetol (CHEMPAKAM e BALAJI, 2008; LI et al., 2010; WANG et al., 2011), mas que são fonte do ácido xiquímico, ingrediente primário usado para fabricar o medicamento antiviral Tamiflu® (fosfato de oseltamivir), que combate a gripe aviária H5N1 (WANG et al., 2011).

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO

### 4.2.1 Testes preliminares por hidrodestilação e por Soxhlet

Diferentes características são observadas em óleos obtidos usando variadas técnicas de extração. A hidrodestilação (aparelho de Clevenger) com amostra triturada produziu OE com forte aroma de anis, transparente, amarelado e com comportamento viscoso à temperatura ambiente (FIGURA 33, A), típico de óleo, solidificando-se e tornando-se branco sob refrigeração. Em contraste, a fração lipídica produzida pelo equipamento Soxhlet exibiu um aroma amargo de anis com odor residual de solvente, além de apresentar baixa viscosidade e uma coloração verde escura (FIGURA 33, B). Essas mesmas características foram relatadas por WANG; JIANG e WEN (2007), que produziram OE por hidrodestilação e fração lipídica total via extração por técnica de Soxhlet com rendimentos de 8,2 e 9,3%, respectivamente. Além disto, sabe-se que a extração por Soxhlet não extrai somente OE, mas sim todas as frações lipídicas e/ou lipossolúveis da amostra, tais como ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, lecitinas, ceras, carotenóides, clorofila e outros pigmentos, esteróis, fosfatídeos, vitaminas A e D, óleos essenciais, que podem atuar como interferentes (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Ainda, as temperaturas de recuperação de solvente causam perda dos compostos voláteis, podendo causar erros na quantificação total do teor lipídico.

FIGURA 33 – ASPECTO VISUAL DAS FRAÇÕES OLEOSAS EXTRAÍDAS DO ANIS-ESTRELADO.



LEGENDA: (A) OE obtido por hidrodestilação;  
(B) Extrato lipídico obtido por Soxhlet.

No presente estudo, o rendimento da hidrodestilação do fruto seco integral ( $3,84 \pm 0,33$  g OE/g bs), bem como para a fração triturada ( $6,41 \pm 0,50$  g OE/g bs), foi menor que a citada (8,2%; WANG; JIANG e WEN, 2007). A moagem teve uma influência muito mais importante no rendimento da extração de Soxhlet ( $1,20 \pm 0,01$  g OE/g bs para o fruto inteiro e  $13,02 \pm 1,09$  g OE/g bs para o triturado). O maior valor pode ser atribuído a não realização da etapa de concentração por rotaevaporação aplicada por WANG; JIANG e WEN (2007), uma vez que as características físicas do óleo cru obtido seriam inadequadas para ingestão (aroma, cor, resíduo solvente).

Deste modo, a hidrodestilação foi escolhida para produção de óleo essencial, sendo necessária sua otimização para garantir maior sustentabilidade e a qualidade do produto.

#### 4.2.2 Óleo essencial obtido na otimização da hidrodestilação por aparelho de Clevenger

Para a extração de OEs, a granulometria e massa do anis-estrelado, assim como o tempo e o volume inicial de água foram investigados para os ensaios de hidrodestilação, visando otimizar a produtividade em função dessas variáveis (TABELA 12).

TABELA 12 – RENDIMENTOS E PRODUTIVIDADES DE OE E TA NA OTIMIZAÇÃO DA HIDRODESTILAÇÃO.

Exp.	IR <sup>1</sup>	Y <sub>BS</sub> OE (g OE/100 g bs) <sup>2</sup>	Produtividade OE (g OE/100 g bs.h)	TA (%)	Y <sub>BS</sub> TA (g TA/100 g bs) <sup>3</sup>	Produtividade TA (g TA/100 g bs.h)
HD1	1,5545	10,2	10,2	96,6	9,85	9,85
HD2	1,5555	5,4	5,4	82,2	4,44	4,44
HD3	1,5534	8,0	8,0	85,5	6,84	6,84
HD4	1,5555	5,1	5,1	85,9	4,38	4,38
HD5	1,5529	10,6	3,5	82,2	8,71	2,90
HD6	1,5555	6,7	2,2	81,3	5,45	1,82
HD7	1,5525	10,8	3,6	80,4	8,68	2,89
HD8	1,5539	7,3	2,4	80,8	5,90	1,97
HD C (1)	1,5537	8,9	4,5	80,0	7,09	3,55
HD C (2)	1,5539	8,9	4,5	78,7	6,99	3,50
HD C (3)	1,5535	8,9	4,5	79,4	7,03	3,52
HD C (i) <sup>4</sup>	1,5537	8,9	4,5	79,4	7,04	3,52

<sup>1</sup>Índice de refração. <sup>2</sup>Rendimento bruto de óleo essencial em base seca (bs). <sup>3</sup>Rendimento bruto de TA em base seca. <sup>4</sup>Média dos 3 pontos centrais do experimento.

A maior quantidade em termos de óleo (10,8 g OE/100 g bs, exp.HD7, (TABELA 12) foi observada para a maior razão de massa entre frutos secos e água (16%), maior tempo de operação (3h), utilizando as partículas mais finas (0-425 µm), ou seja, com maior área superficial, e baixo volume de água destilada (200 mL), obtendo uma produtividade de 3,6 g OE/ (100 g bs.h). Entretanto, a HD1 obteve os maiores valores de produtividade, tanto para quantidade de OE, quanto para TA.

A produtividade de HD1 para OE (10,2 g OE/[100 g bs. h]) superou em muito os valores citados em literatura, de 4% para 2 h de extração (2,0 g OE/[100 g bs. h]) e 8,2% para 5 h (produtividade de 1,64 g OE/[100 g bs. h]) relatados por BHADRA et al. (2011) e WANG et al. (2007). Isto significa um valor de 410% e 522% superior a estes, respectivamente. Isto confirma a importância da otimização das condições na extração do óleo essencial da matriz. Aplicando-se ANOVA (TABELA 13) ( $R^2 = 0,9567$ ), o efeito da granulometria (G) foi significativo ( $p = 0,006 < 0,050$ ) para o rendimento, enquanto o tempo (t) foi marginalmente significativo ( $p = 0,050$ ).

TABELA 13 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA,  $R^2 = 0,9567$ ) PARA  $Y_{BSOE}$  (g OE/100 g bs).

Fator	SS	df	MS	F	p
(1) G ( $\mu$ m)	28,76035	1	28,76035	51,25163	0,005613
(2) m (%)	0,33418	1	0,33418	0,59551	0,496508
(3) t (h)	5,65212	1	5,65212	10,07222	0,050338
(4) V (mL)	0,30398	1	0,30398	0,54170	0,515056
G por m	0,69613	1	0,69613	1,24051	0,346575
G por t	0,01382	1	0,01382	0,02463	0,885254
G por V	1,47144	1	1,47144	2,62213	0,203820
Erro	1,68348	3	0,56116		
Total SS	38,91549	10			

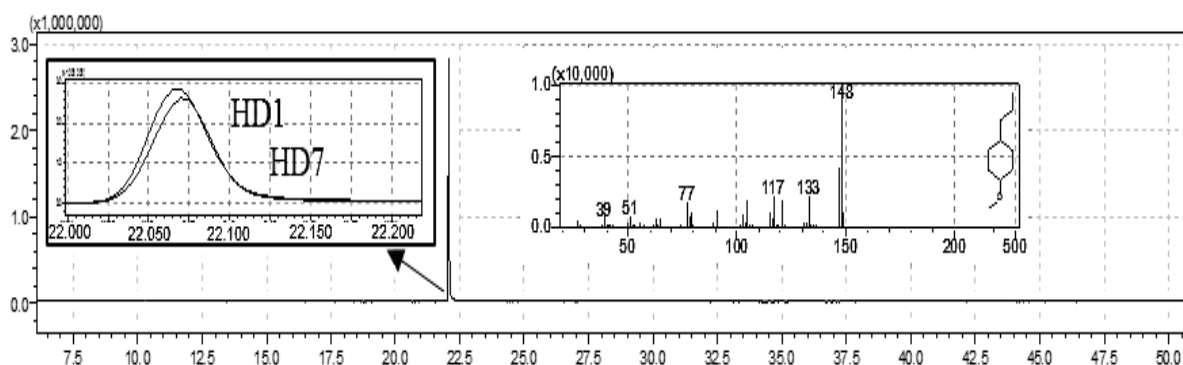
Sobre os índices de refração obtidos para diferentes OEs (TABELA 12), teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) revelou que a amostra HD7 apresenta uma diferença significativa quando comparada às amostras HD2 ( $p = 0,044$ ), HD4 ( $p = 0,044$ ), HD6 ( $p = 0,044$ ) e TA ( $p = 0,025$ ). TA diferiu de HD3 ( $p = 0,041$ ), HD5 ( $p = 0,031$ ), HD7 ( $p = 0,025$ ), e de HD C (i) ( $p = 0,034$ ). O parâmetro foi ligeiramente inferior ao do TA padrão (1,5565) e dados relatados por outros autores para OE de anis-estrelado: 1,5553 (TUAN; ILANGANTILEKET, 1997) e 1,5585 (GARBER; HERRLINGER; CIESIELSKI, 1962) ambos a 25°C.

Para os OEs provenientes da HD - tanto das amostras trituradas, quanto do teste preliminar de amostra integral - as umidades por teste Karl Fischer (item 3.3.1) resultaram em  $0,11 \pm 0,01\%$ . No caso do padrão TA, o valor foi de  $0,10 \pm 0,01\%$ , indicando similaridade de procedimento de desidratação entre o produto obtido e a referência.

O trans-anetol (TA) foi o principal componente quantificado em óleo essencial de anis-estrelado (TABELA 12) por análise por GC-MS, em concordância com o descrito em estudos anteriores (ASIF et al., 2016; BHADRA et al., 2011; CHOUKSEY; UPMANYU; PAWAR, 2013; HOWES; KITE; SIMMONDS, 2009; WANG; JIANG e WEN, 2007; ZHAI et al., 2009). A ampliação da imagem (FIGURA 34) da análise GC-MS enfatiza as condições um (HD1) e sete (HD7) de hidrodestilação, uma vez que elas produziram maior teor de TA e massa de óleo, respectivamente. No presente estudo também foram identificados vestígios de compostos relatados por muitos outros autores: o estragol (CHOUKSEY; UPMANYU; PAWAR, 2013; HOWES; KITE; SIMMONDS, 2009; WANG et al., 2011; WONG; LEE; NURDIYANA, 2014), D-limoneno (CHOUKSEY; UPMANYU; PAWAR, 2013; ZHAI et al., 2009) e a feniculina, sendo que esta substância foi relatada nas espécies comestíveis de anis-estrelado (CHOUKSEY; UPMANYU; PAWAR, 2013; HOWES; KITE; SIMMONDS, 2009). A

presença desta substância indica que as amostras utilizadas no presente estudo são comestíveis, pois espécies tóxicas (*I. anisatum*) não contém feniculina (HOWES; KITE; SIMMONDS, 2009). Pineno,  $\beta$ -felandreno, safrol, farnesol e  $\alpha$ -terpineol (CHOUKSEY; UPMANYU; PAWAR, 2013) não foram identificados.

FIGURA 34- CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSA DO OE OBTIDO NAS CONDIÇÕES DE HIDRODISTILAÇÃO UM (HD1) E SETE (HD7).



LEGENDA: Na ampliação, à esquerda: HD1 e HD7. À direita: espectro de massas.

Para fins de TA (%) (TABELA 12), HD1 exibiu o maior grau de pureza (96,6%), porém aplicando-se teste de ANOVA para os parâmetros estudados, não houve indicação de efeitos significativos ( $p < 0,050$ ).

No caso do rendimento em pureza do OE ( $Y_{BS}TA$ ,  $R^2 = 0,9952$ ), este foi altamente afetado pela granulometria ( $p = 0,0002$ ), confirmando sua dependência da porção anisotrópica do vegetal. Tempo ( $t$ ,  $p = 0,017$ ), massa ( $m$ ,  $p = 0,030$ ) e volume ( $V$ ,  $p = 0,033$ ) são estatisticamente significativos ( $p < 0,050$ ), mas inferiores às interações lineares GV ( $p = 0,013$ ) e Gm ( $p = 0,014$ ), que parecem ser marginalmente significativos. Portanto, embora a condição HD7 exiba maior quantidade de OE, as melhores produtividades para obtenção de óleo rico em TA são as do experimento HD1: tamanho menor que  $425 \mu m$ , 8% (m/v) de massa, 200 mL de água e 1 h de extração. Assume-se, então, que um tempo de extração mais longo, além de mais oneroso, promove maior degradação do composto bioativo de interesse.

Ainda sobre o rendimento de TA no OE, este pode ser descrito pela Equação 7, a partir da qual pode-se comparar os valores previstos pelo modelo e os observados empiricamente (TABELA 14), verificando-se baixo desvio-padrão entre os dados.

$$Y_{BS}TA \left( g \frac{TA}{100 g bs} \right) = -0,0190.G - 0,4044.m + 0,4038.t - 0,0108.V + 5,04.10^{-4}.G.m + 1,37.10^{-5}.G.V + 19,8863 \quad (7)$$

TABELA 14 - VALORES PREDITOS E OBSERVADOS RENDIMENTO DE TA NO OE  
( $Y_{BS}TA$  [g TA/ 100 g bs]).

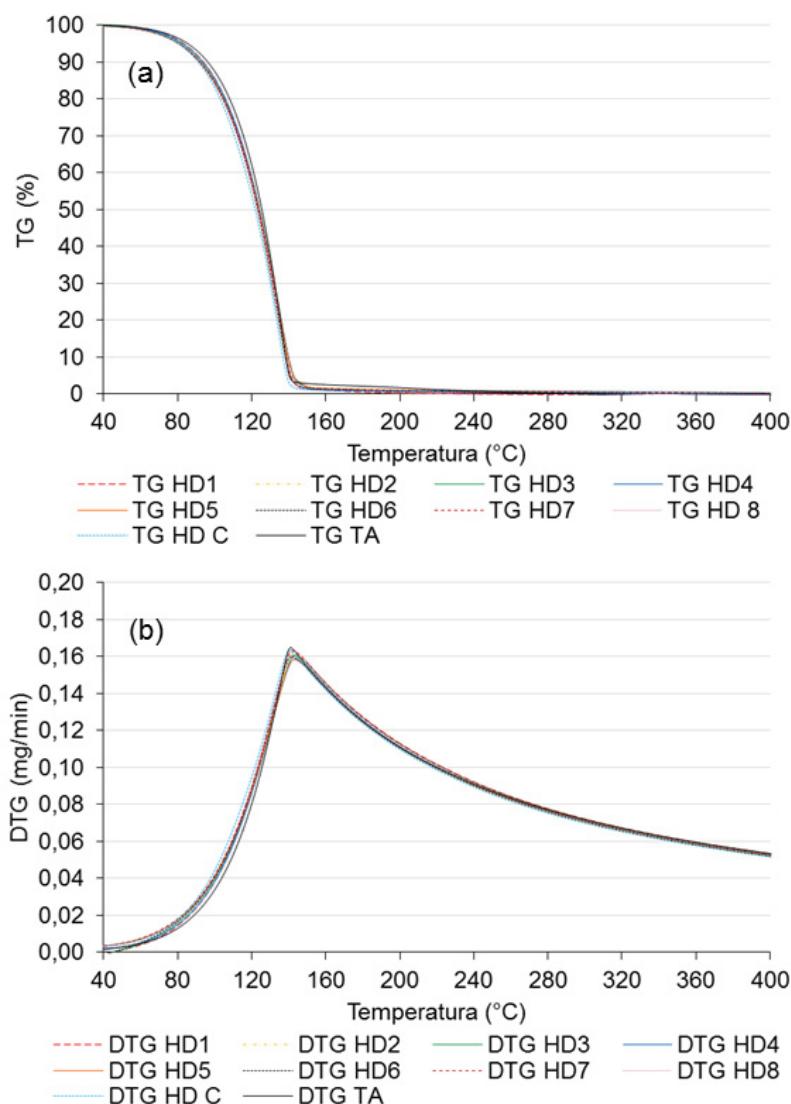
Experimentos	Valores preditos <sup>1</sup>	Valores observados	Desvio-padrão
HD1	9,69	9,85	0,08
HD2	4,74	4,44	0,15
HD3	6,68	6,84	0,08
HD4	4,68	4,38	0,15
HD5	9,01	8,71	0,15
HD6	5,29	5,45	0,08
HD7	8,98	8,68	0,15
HD8	5,74	5,90	0,08
HDC (i)	6,85	7,04	0,09
HDC (1)	6,85	7,09	0,12
HDC (2)	6,85	6,99	0,07
HDC (3)	6,85	7,03	0,09

<sup>1</sup>Valores preditos pelo modelo do planejamento experimental.

Quanto às análises térmicas dos OEs (FIGURA 35), estas também demonstram a similaridade de composição entre as amostras estudadas e o padrão, confirmando que a composição dos OEs obtidos consiste majoritariamente TA em sua composição. A curva de HD1 foi a que mais se aproximou da de TA, enquanto a de HD C foi a de maior distanciamento, conforme o esperado em função do teor de TA (TABELA 12). Entretanto, a análise termogravimétrica não aponta outros possíveis elementos-traço nas amostras, tal como a determinação do índice de refração.



FIGURA 35 – CURVA DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (a) E SUA DERIVADA (b) PARA OEs DA HD E PADRÃO TA.



Verifica-se, então, que apesar do índice de refração e das análises térmicas serem indicativos para confirmação do tipo de óleo essencial, apenas a GC-MS é capaz de caracterizar sua composição, sendo tal metodologia reportada em literatura (ASIF et al., 2016; BHADRA et al., 2011; CHOUKSEY; UPMANYU; PAWAR, 2013; DZAMIC et al., 2009; SINGH et al., 2006; WANG; JIANG; WEN, 2007; ZHAI et al., 2009) para esta finalidade.



#### 4.2.3 Remoagem das frações trituradas de anis-estrelado comercial

A operação sucessiva de trituração ( $T_i$ ,  $i = 1-5$ ) na condição padronizada de 20 g por 20 s (item 4.1.4), com frações destinadas à hidrodestilação de acordo com a condição HD1, afeta o rendimento de OE e TA (TABELA 15).

TABELA 15 - QUALIDADE DO OE OBTIDO DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS A DIFERENTES MOAGENS SUBSEQUENTES.

Teste	$Y_{BS}$ (g OE/g bs) <sup>1</sup>	Índice de refração	TA (%)
T1	$10,0 \pm 0,2^a$	1,5539 <sup>a</sup>	$96,0 \pm 0,5^a$
T2	$5,1 \pm 0,4^b$	1,5535 <sup>a</sup>	$72,8 \pm 4,5^b$
T3	$3,8 \pm 0,5^{bc}$	1,5535 <sup>a</sup>	$49,8 \pm 1,6^c$
T4	$3,7 \pm 0,4^{bc}$	1,5535 <sup>a</sup>	$48,8 \pm 1,4^c$
T5	$1,4 \pm 0,6^c$	1,5520 <sup>a</sup>	$45,5 \pm 0,9^c$

\*Teste de Tukey: letras iguais na mesma coluna indicam igualdade estatística ( $p \geq 0,05$ ).<sup>1</sup>Rendimento bruto de óleo essencial em base seca (bs).

De acordo com um teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), a primeira trituração diferiu das demais, gerando um óleo com maior grau de pureza com referência ao composto de interesse. As remoagens sucessivas do retido na mesma amostra peneirada, houve redução na produção de óleo essencial (g OE/g bs), índice de refração e TA (%), atingindo ao final de 5 moagens (T5)  $1,4 \pm 0,6$  g OE/g bs, 1,5520 e  $45,5 \pm 0,9\%$ , respectivamente. Isto pode provar a suposição de que a moagem sucessiva resulta não apenas na trituração dos folículos do fruto, mas também na quebra das sementes de anis-estrelado, que contêm pouco óleo volátil (CHEMPAKAM e BALAJI, 2008; LI et al., 2010; WANG et al., 2011), o que prejudica o rendimento de OE e a pureza em TA.

#### 4.2.4 Determinação do teor de compostos antioxidantes

A influência das condições de extração (HD) na atividade antioxidante (TABELA 16) do óleo obtido foi avaliada por quatro diferentes metodologias analíticas (CFT, FRAP, ABTS e DPPH,) para também estimar suas influências (FIGURA 36). O óleo essencial obtido na condição HD5 ( $G < 425 \mu m$ , m 8%, 3h, 500 mL) apresentou maior capacidade antioxidante (TABELA 16), superando inclusive o TA usado como referência. Esta substância pura apresentou valores similares entre FRAP e ABTS (somente 5,8% maior, TABELA 17). O valor de DPPH foi quase o dobro (98,8% maior)

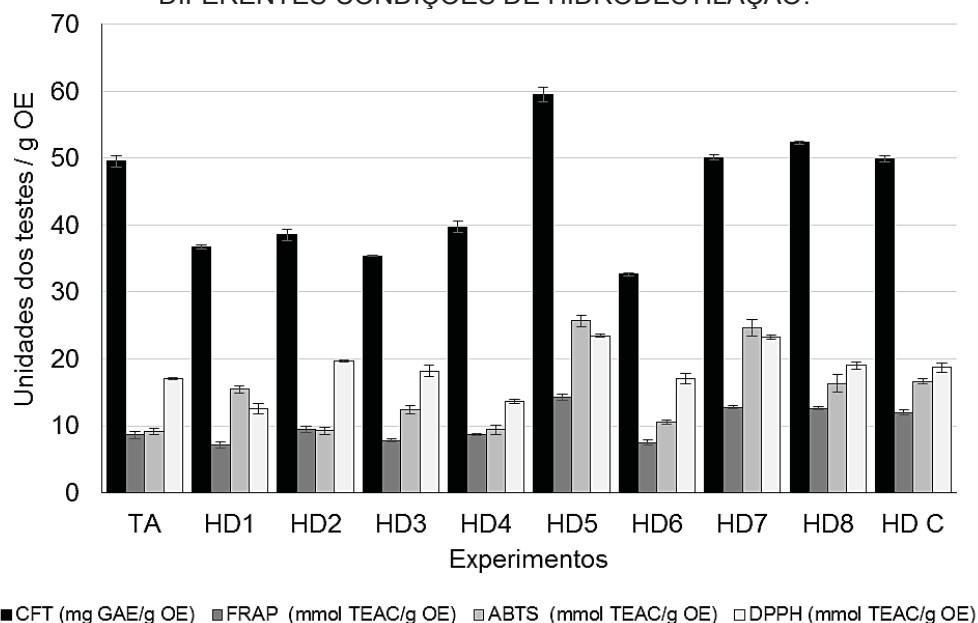
do que os dois primeiros e o CFT foi quase 5 vezes maior (475,6%) que FRAP e ABTS. Isto revela que a ordem de grandeza de atividade antioxidante não pode ser usada diretamente para descrever sua atividade e, logicamente, impede a sua comparação de dados obtidos pelo uso de metodologias distintas.

TABELA 16 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PARA DIFERENTES OEs EXTRAÍDOS.

Exp.	G (µm) <sup>1</sup>	m <sup>2</sup> (%)	t (h) <sup>3</sup>	V (mL) <sub>4</sub>	CFT (GAE/g OE)	FRAP (TEAC/g OE)	ABTS (TEAC/g OE)	DPPH (TEAC/g OE)
TA <sup>5</sup>	-	-	-	-	49,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	8,6 ± 0,6 <sup>ac</sup>	9,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	17,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
HD1	< 425	8	1	200	36,7 ± 0,3 <sup>b</sup>	7,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	15,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	12,5 ± 0,8 <sup>b</sup>
HD2	> 850	8	1	500	38,6 ± 0,9 <sup>c</sup>	9,4 ± 0,4 <sup>c</sup>	9,2 ± 0,5 <sup>ae</sup>	19,7 ± 0,1 <sup>c</sup>
HD3	< 425	16	1	500	35,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	7,8 ± 0,2 <sup>abd</sup>	12,4 ± 0,6 <sup>c</sup>	18,2 ± 0,9 <sup>ac</sup>
HD4	> 850	16	1	200	39,7 ± 0,8 <sup>c</sup>	8,7 ± 0,2 <sup>acde</sup>	9,4 ± 0,7 <sup>ae</sup>	13,6 ± 0,3 <sup>b</sup>
HD5	< 425	8	3	500	59,6 ± 1,1 <sup>d</sup>	14,3 ± 0,5 <sup>f</sup>	25,7 ± 0,8 <sup>d</sup>	23,5 ± 0,3 <sup>d</sup>
HD6	> 850	8	3	200	32,6 ± 0,3 <sup>e</sup>	7,5 ± 0,4 <sup>ab</sup>	10,5 ± 0,3 <sup>ace</sup>	17,1 ± 0,8 <sup>a</sup>
HD7	< 425	16	3	200	50,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	12,7 ± 0,2 <sup>g</sup>	24,6 ± 1,3 <sup>d</sup>	23,3 ± 0,3 <sup>d</sup>
HD8	> 850	16	3	500	52,3 ± 0,2 <sup>f</sup>	12,6 ± 0,2 <sup>g</sup>	16,3 ± 1,4 <sup>b</sup>	19,0 ± 0,5 <sup>c</sup>
HD C (i) <sup>6</sup>	425 <G < 850	12	2	350	49,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	12,0 ± 0,7 <sup>g</sup>	16,6 ± 0,8 <sup>b</sup>	18,7 ± 0,8 <sup>ac</sup>
HD C (1) <sup>7</sup>	425 <G < 850	12	2	350	50,6 ± 0,3	12,5 ± 0,5	17,2 ± 1,0	17,9 ± 0,9
HD C (2) <sup>7</sup>					49,3 ± 0,4	11,5 ± 0,5	16,3 ± 0,9	18,4 ± 0,8
HD C (3) <sup>7</sup>					49,8 ± 1,3	12,0 ± 0,8	16,4 ± 0,4	19,8 ± 0,8
R <sub>modelo</sub> <sup>2-8</sup>					0,8586	0,8166	0,9533	0,9311

<sup>1</sup>Granulometria do anis-estrelado triturado. <sup>2</sup>Massa de amostra adicionada ao sistema. <sup>3</sup>Tempo do processo de hidrodestilação. <sup>4</sup>Volume de água destilada adicionada ao sistema. <sup>5</sup>Padrão de trans-anetol. <sup>6</sup>Média dos pontos centrais. <sup>7</sup>Pontos centrais em triplicatas, i = 1-3. <sup>8</sup>R<sup>2</sup> do planejamento fatorial fracionado 2<sup>4-1</sup>. \* A mesma letra não difere significativamente pelo teste de Tukey (p $\geq$ 0,05).

FIGURA 36 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO TA PADRÃO E DOS OEs OBTIDOS POR DIFERENTES CONDIÇÕES DE HIDRODESTILAÇÃO.



Conhecendo os valores de TA obtidos com as quatro diferentes metodologias e sabendo-se que o teor de TA no óleo HD5 foi de 82,2%, era de se esperar que os valores de CFT fossem de 40,7 GAE/g OE, FRAP de 7,1, ABTS de 7,5 e DPPH de 14,1 TEAC/g OE (TABELA 17), ou seja, esses seriam os valores hipotéticos quando multiplicados os valores obtidos pelo padrão TA por 82,2%. No entanto, os valores reais obtidos nas análises foram de 59,6 GAE/g OE, 14,3, 25,7 e 23,5 TEAC/g OE, respectivamente. Tal fato indica que a capacidade antioxidante do óleo essencial pode não ser devido somente ao trans-anetol, como descrito por alguns autores (CAI et al., 2013; WANG et al., 2011; WONG; LEE; NURDIYANA, 2014), mas também a outros compostos presentes no óleo essencial. Ainda, os outros componentes podem ser até mais efetivos como antioxidantes do que o próprio TA; inclusive a extração destes subcomponentes pode ser mais sensível à condição de extração. Esta hipótese é reforçada pela diferença de capacidade antioxidante do óleo HD5, a qual foi estimada para as diversas metodologias com base na composição de TA presente, ou seja, 82,2%.

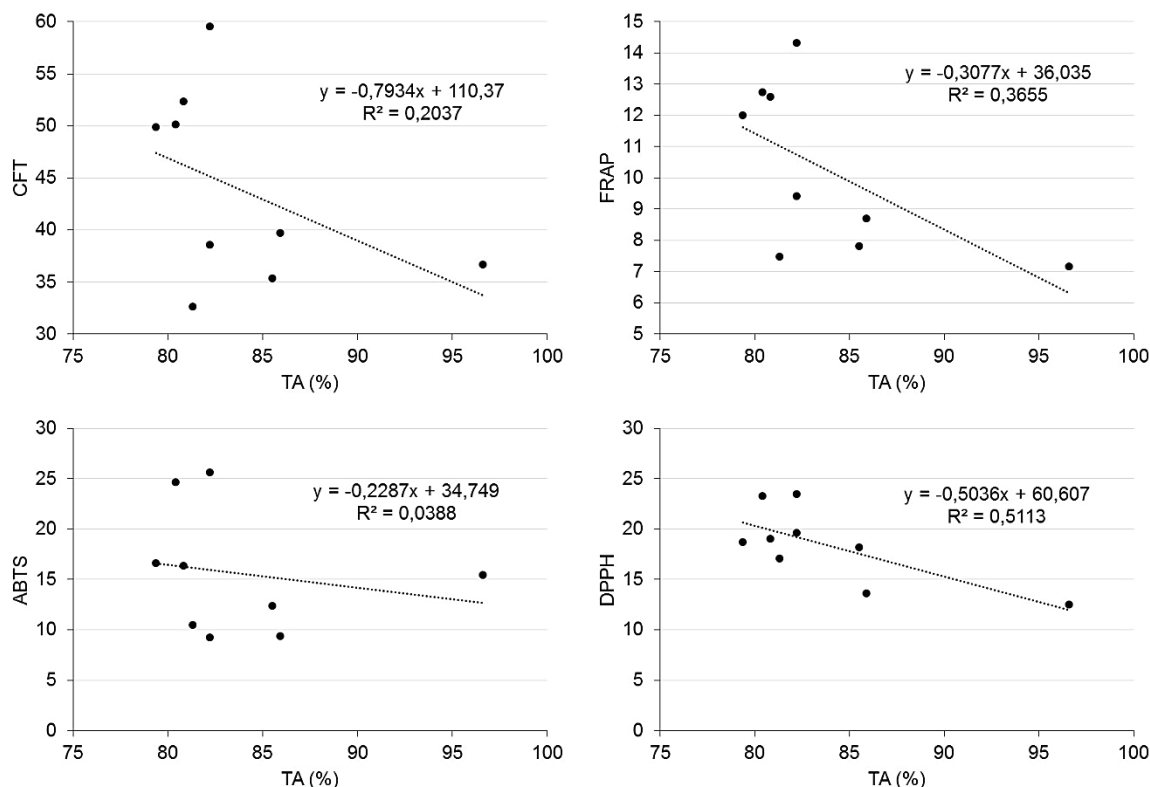
TABELA 17 - VALORES HIPOTÉTICOS E REAIS PARA O HD5, BASEADOS NA COMPOSIÇÃO DE TA E COMPARAÇÃO COM O D-LIMONENO.

	TA			HD5				D-lim <sup>1</sup>
	Valores reais	Veze maior que FRAP	Maio r que FRAP (%)	Valores hipotéticos	Valores reais	Veze maior que FRAP	Maio r que FRAP (%)	Valores reais
<b>CFT (GAE/g)</b>	49,5	5,756	475,6	40,7	59,6	4,168	316,8	26,7
<b>FRAP (TEAC/g)</b>	8,6	1,000	0,0	7,1	14,3	1,000	0,0	2,5
<b>ABTS (TEAC/g)</b>	9,1	1,058	5,8	7,5	25,7	1,797	79,7	3,0
<b>DPPH (TEAC/g)</b>	17,1	1,988	98,8	14,1	23,5	1,643	64,3	10,1

<sup>1</sup>D-limoneno.

Essa falta de correlação entre o teor de TA das diferentes condições de extração e os sinais analíticos de capacidade antioxidante foram confirmados pelo baixo coeficiente de determinação ( $R^2$ , FIGURA 37).

FIGURA 37 - CORRELAÇÕES ENTRE A COMPOSIÇÃO DE TA (%) NO OE *VERSUS* VALORES OBTIDOS NOS TESTES DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.



Testes cromatográficos em GC-MS foram aplicados para verificar quais outros compostos poderiam ter contribuído para a atividade antioxidante. Em HD1, HD3, HD5, HD8, HD C (i) foram observados traços de D-limoneno e estragol (TABELA 18). Em HD2, HD4 e HD6, traços de estragol. Em HD7, foram observados traços de D-limoneno, estragol e fenculina. Em literatura, estragol (CHOUKSEY; UPMANYU; PAWAR, 2013; HOWES; KITE; SIMMONDS, 2009; WANG et al., 2011; WONG; LEE; NURDIYANA, 2014), D-limoneno (CHOUKSEY; UPMANYU; PAWAR, 2013; PADMASHREE et al., 2007; ZHAI et al., 2009) e fenculina (CHOUKSEY; UPMANYU; PAWAR, 2013; SCOPEL et al., 2016; SINGH et al., 2006) são compostos naturalmente presentes no óleo essencial de anis-estrelado comestível (OE).

Deste modo, a capacidade antioxidante de D-limoneno, em quantidade mais significativa do que o estragol na amostra HD5, de maior poder antioxidante, foi também verificada (TABELA 17), sendo de 26,7 GAE/g ( $\pm 1,3$ ) para o CFT, 2,5 ( $\pm 0,2$ ) TEAC/g para o FRAP, 3,0 ( $\pm 0,3$ ) TEAC/g para ABTS e 10,1 ( $\pm 0,2$ ) TEAC/g para DPPH. Como esses valores foram inferiores ao TA, essa atividade antioxidante excepcional do HD5 deve ser atribuída a outro componente traço ou, então, pode-se dizer que há possível efeito sinérgico entre os componentes do OE, como relatado

previamente (SCOPEL et al., 2016; SINGH et al., 2006). Nessa hipótese, o potencial antioxidante previsto por ABTS (25,7 TEAC/g OE) para o óleo HD5 foi 79,7% maior do que para o FRAP (14,3 TEAC/g OE), sendo que comportamento anterior foi de apenas 5,8%. Já o DPPH (23,5 TEAC/g OE) superou o FRAP em 64,3%. Logo, esses comportamentos atípicos só podem ser justificados pela presença de outros compostos antioxidantes extraídos seletivamente de acordo com as condições de hidrodestilação.

TABELA 18 – TEORES DE D-LIMONENO E ESTRAGOL NAS AMOSTRAS DE HD.

Exp.	D-limoneno/área do pico	Estragol/ área do pico	D-limoneno (%)	Estragol (%)
HD1	18813	42596	1,04	2,36
HD2	0	54372	0,00	17,80
HD3	77937	78460	7,23	7,27
HD4	0	58963	0,00	14,10
HD5	51485	39095	10,12	7,68
HD6	0	25646	0,00	18,70
HD7	51491	45415	10,41	9,19
HD8	47468	29735	11,81	7,39
HD C (i) <sup>2</sup>	50384	38939	11,62	8,98
HD C (1)	49631	40115	11,06	8,94
HD C (2)	49798	38405	12,03	9,27
HD C (3)	51722	38298	11,84	8,76

A análise de variância (ANOVA, TABELA 19) para CFT indicou que houve influência significativa ( $p < 0,05$ ) entre os seguintes fatores e/ou interações testados para hidrodestilação: t, interação Gm, interação Gt, V, G, interação GV e m. Interações tV e tm não foram significativas. O modelo de regressão mostrou que o óleo com melhor capacidade antioxidante foi o obtido com o maior tempo de extração (3h), menor tamanho de partícula ( $< 425 \mu\text{m}$ ), de maior área superficial, maior volume (500 mL) e menor adição de massa (8%). Isto já confirmado pela condição HD5, que por teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), foi estatisticamente superior às demais (TABELA 16).

A maior capacidade antioxidante de acordo com teste FRAP foi também observada para o conjunto de condições HD5 (TABELA 16), com p-valores revelando uma significância estatística para os fatores semelhantes aos do teste TP: t, Interação Gt, V, interação Gm, G, interação GV e m (TABELA 19, coluna FRAP).

TABELA 19 - RESUMO DOS EFEITOS TESTADOS NA HIDRODESTILAÇÃO NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO.

	Valores de p			
	CFT	FRAP	ABTS	DPPH
G	0,000	0,004	0,000	0,000
m	0,011	0,010	0,187 <sup>1</sup>	0,199 <sup>1</sup>
t	0,000	0,000	0,000	0,000
V	0,000	0,000	0,014	0,000
Gm	0,000	0,000	0,000	0,000
Gt	0,000	0,000	0,000	0,000
GV	0,009	0,007	0,000	0,000
R <sub>modelo</sub> <sup>2</sup>	0,859	0,817	0,953	0,931

<sup>1</sup>Não significativo ( $p > 0,050$ ). <sup>2</sup>Coeficiente de determinação do planejamento fatorial fracionado 2<sup>4-1</sup>.

G = Granulometria do anis-estrelado triturado. m = Massa de amostra adicionada ao sistema.

t = Tempo do processo de hidrodestilação. V = Volume de água destilada adicionada ao sistema

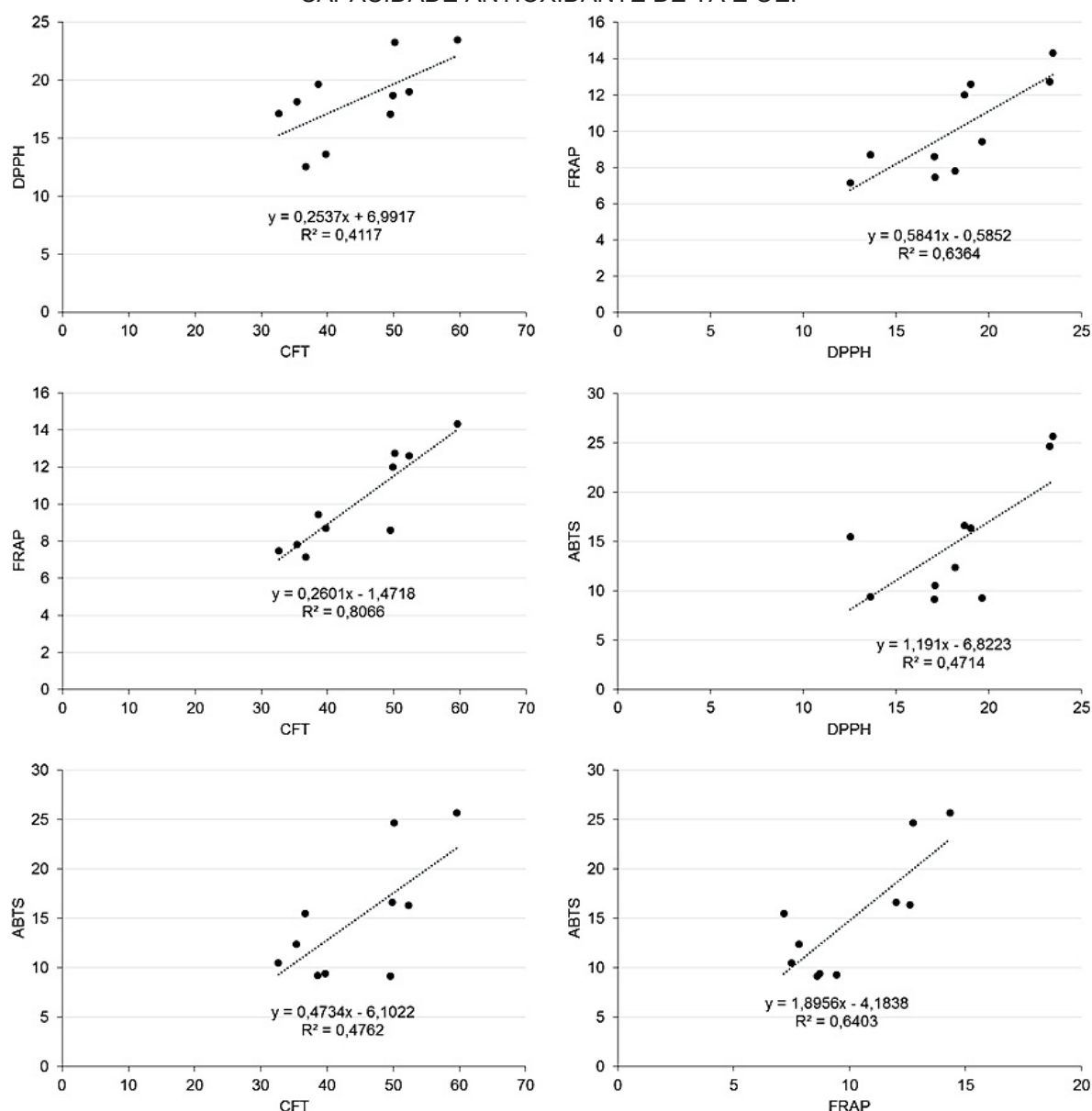
Em relação a capacidade antioxidante segundo os métodos ABTS e DPPH, m não é significativo (TABELA 19). De acordo com o teste de Tukey (TABELA 16) para ambos os métodos, HD5 e HD7 não diferiram entre si e apresentaram maior capacidade antioxidante do que as demais condições.

De maneira geral, maior tempo de extração, menor granulometria e maiores volumes de água destilada são os parâmetros que afetam positivamente a propriedade de capacidade antioxidante dos óleos produzidos. A massa de amostra adicionada ao sistema foi indiferente. Nesse contexto, a avaliação como CFT, que engloba vários compostos fenólicos, é generalista, sendo que também apresenta influência positiva para vários contaminantes, inclusive açúcares redutores e aminoácidos (SHAHIDI; ZHONG, 2015). Nesse sentido, a capacidade antioxidante é mais especificamente revelada por FRAP, ABTS e DPPH, embora diferenças de valores e coeficientes de determinação dos modelos (TABELA 19) entre um método e outro provém das condições específicas da reação de cada metodologia, tais como aplicação de meio ácido (FRAP), soluções aquosas (ABTS) e metanol como solvente (DPPH).

Essa divergência é confirmada pelos seus coeficientes de determinação de respostas (FIGURA 38), sendo que FRAP e ABTS ( $R_{\text{FRAP-ABTS}}^2 = 0,6403$ ) é a melhor e pouco superior a FRAP e DPPH ( $R_{\text{FRAP-DPPH}}^2 = 0,6364$ ). A divergência entre ABTS e DPPH ( $R_{\text{ABTS-DPPH}}^2 = 0,4714$ ) pode estar relacionada ao tipo de meio de reação aquoso do ABTS. Apesar da falta de seletividade da CFT, o que poderia explicar os baixos ajustes ( $R_{\text{OutrosPares-CFT}}^2$ ) de CFT com DPPH ou com ABTS, o coeficiente de determinação foi o melhor de todos para a FRAP ( $R_{\text{CFT-FRAP}}^2 = 0,8066$ ), sendo esta

realizada em meio aquoso-ácido. Esta falta de correlação entre as metodologias analíticas foi inesperada, uma vez que todos os métodos apresentaram um valor alto para o coeficiente de determinação das curvas de calibração ( $R_{CFT}^2 = 0,9941$ ,  $R_{FRAP}^2 = 0,9971$ ,  $R_{ABTS}^2 = 0,9974$ ,  $R_{DPPH}^2 = 0,9960$ ). Isso é compatível com uma alta precisão nos resultados, mas sem exatidão.

FIGURA 38 - CORRELAÇÕES ENTRE AS RESPOSTAS DOS DIFERENTES TESTES DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE TA E OE.



Para previsibilidade do comportamento por metodologia de superfície de resposta ao planejamento experimental aplicado, apesar da metodologia ABTS apresentar maior ajuste ( $R_{\text{modelo},ABTS}^2 = 0,9533$ ), verificou-se reação dos compostos



nos micropoços analisados, gerando turvamento irreversível nos mesmos. Deste modo, para evitar interferências, sugere-se aplicar a metodologia de determinação de capacidade antioxidante por DPPH, também com bom ajuste ( $R_{\text{modelo,DPPH}^2} = 0,9311$ ), com capacidade antioxidante podendo ser prevista pela Equação 8, a partir da qual permite comparar os valores previstos pelo modelo e os observados empiricamente (TABELA 20), verificando-se baixo desvio-padrão entre os dados. Além disto, no DPPH o solvente utilizado (metanol) é comumente aplicado no estudo de extratos de *Illicium verum* Hook, como se observa em literatura devido sua afinidade à fração oleosa (ASIF et al., 2016; BHADRA et al., 2011; LI et al., 2010; PADMASHREE et al., 2007; WANG; JIANG e WEN, 2007; WANG et al., 2011; WONG; LEE; NURDIYANA, 2014).

$$DPPH \left( \frac{TEAC}{g} OE \right) = 0,0078.G + 10,0944.t + 0,0221.V - 0,0078.G.t + 8,39.10^{-3}.G.V - 0,0080.t.V - 0,8486 \quad (8)$$

TABELA 20 - VALORES PREDITOS E OBSERVADOS PARA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE POR TESTE DPPH.

Experimentos	Valores preditos <sup>1</sup>	Valores observados	Desvio-padrão
HD1	12,81	12,54	0,13
HD2	19,92	19,65	0,13
HD3	18,10	18,18	0,04
HD4	13,55	13,63	0,04
HD5	23,73	23,47	0,13
HD6	17,38	17,11	0,13
HD7	23,22	23,30	0,04
HD8	18,96	19,04	0,04
HDC (i)	18,46	18,71	0,12
HDC (1)	18,46	17,87	0,29
HDC (2)	18,46	18,43	0,02
HDC (3)	18,46	19,82	0,68

<sup>1</sup>Valores preditos pelo modelo do planejamento experimental.

De modo geral, as metodologias utilizadas para avaliar o potencial antioxidante não puderam ser correlacionadas. Assim, embora o teste DPPH tenha apresentado melhor compatibilidade com o OE, as quatro metodologias podem ser utilizadas simultaneamente, uma vez que não há padronização específica da aplicação dos métodos; cada um pode apresentar um certo mecanismo de reação, obtendo

resultados que refletem diferentes atividades fisiológicas (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Esta aplicação de várias metodologias simultaneamente é frequentemente relatada na literatura, tal como para *asam gelugur* (*Garcinia atroviridis*) (AL-MANSOUB; ASMAWI; MURUGAIYAH, 2014), vários frutos brasileiros (RUFINO et al., 2010), resíduos de amora (*Rubus fruticosus* L.) (PAULA et al., 2015), guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) (PEREIRA et al., 2015), sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) (SANTOS et al., 2015), pitaya vermelha (*Hylocereus polyrhizus*) (WU et al., 2006) e chá verde (*Camellia sinensis* L.) (WANG et al., 2012).

Em todas as análises, HD5 apresentou maior capacidade antioxidante, seguida da condição HD7, ambas com OE extraído de frações menores que 425  $\mu$ m e com 3 h de processo. Este tempo de extração recupera não somente trans-anetol, mas também outros compostos antioxidantes, confirmados por GC-MS. Os resultados obtidos para HD5 foram comparados com os valores da literatura: para CFT, o valor ( $59,56 \pm 1,08$  GAE/g OE) pode ser considerado o mesmo que o obtido por ASIF et al. (2016) para óleo essencial de anis-estrelado ( $63,51 \pm 3,24$  GAE/g OE). Em relação aos frutos desidratados, para análise ABTS, o valor indicado por WANG et al., (2011), de 0,203 TEAC/g de amostra foi inferior ao obtido no presente trabalho, de  $25,65 \pm 0,84$  TEAC/g OE. Obviamente, isto se deve ao fato da hidrodestilação levar à obtenção de um óleo mais purificado e com maior concentração dos compostos do que na forma comercial desidratada. OE da condição HD5 apresentou atividade antioxidante ( $23,47 \pm 0,26$  mmol/g) maior do que no anis comum (*Pimpinella anisum* L.;  $12,52 \pm 0,66$  mmol/g), coentro (*Coriandrum sativum* L.;  $4,96 \pm 0,22$  mmol/g) e mostarda branca (*Sinapis alba*;  $7,39 \pm 0,29$  mmol/g) (KOZLOWSKA et al., 2016).

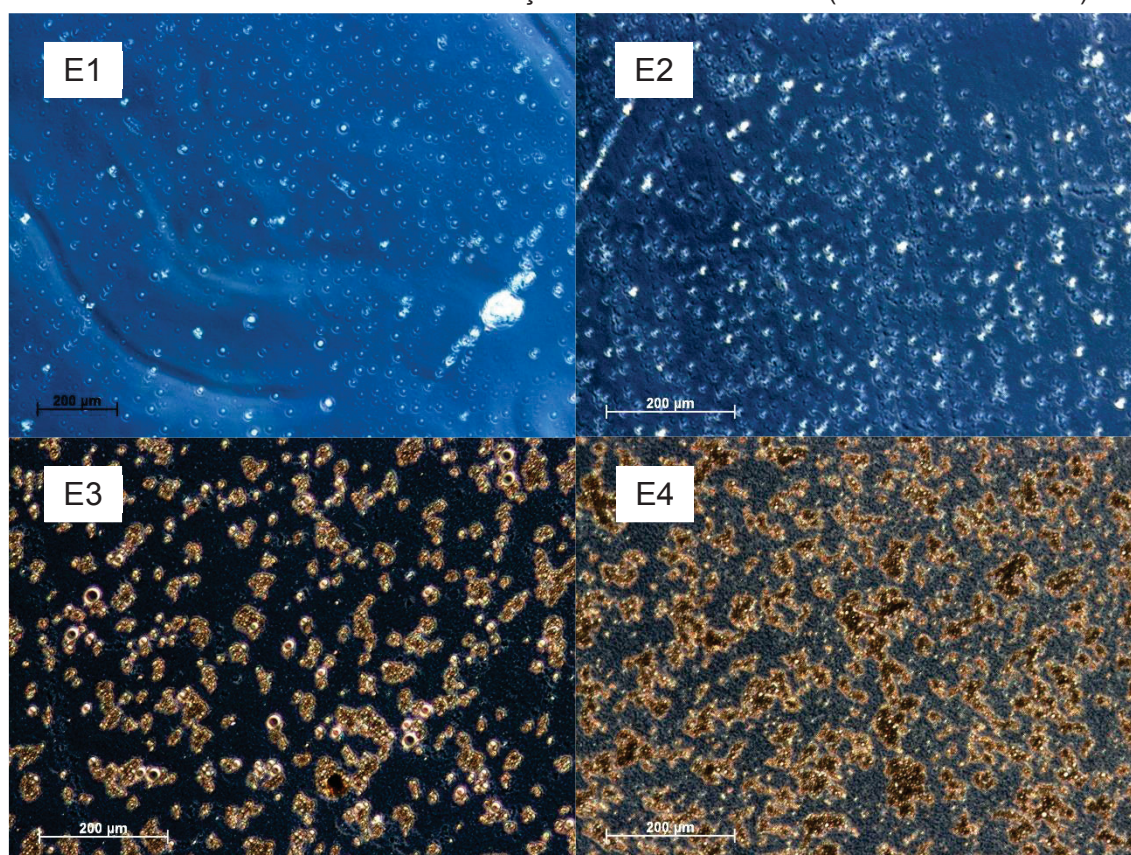
Apesar da presença de outros compostos além de TA, a proporção destes na capacidade antioxidante não foi conclusiva, mas supõe-se que haja efeito sinérgico entres eles, tal como sugerido por Scopel et al. (2016) e Singh et al. (2006).

### 4.3 EMULSIFICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS-ESTRELADO

#### 4.3.1 Análise Microscópica e Distribuição do Tamanho de Gota

Imediatamente após o preparo das emulsões (TABELA 5), foram feitas micrografias (FIGURA 39) a fim de se verificar a homogeneidade obtida.

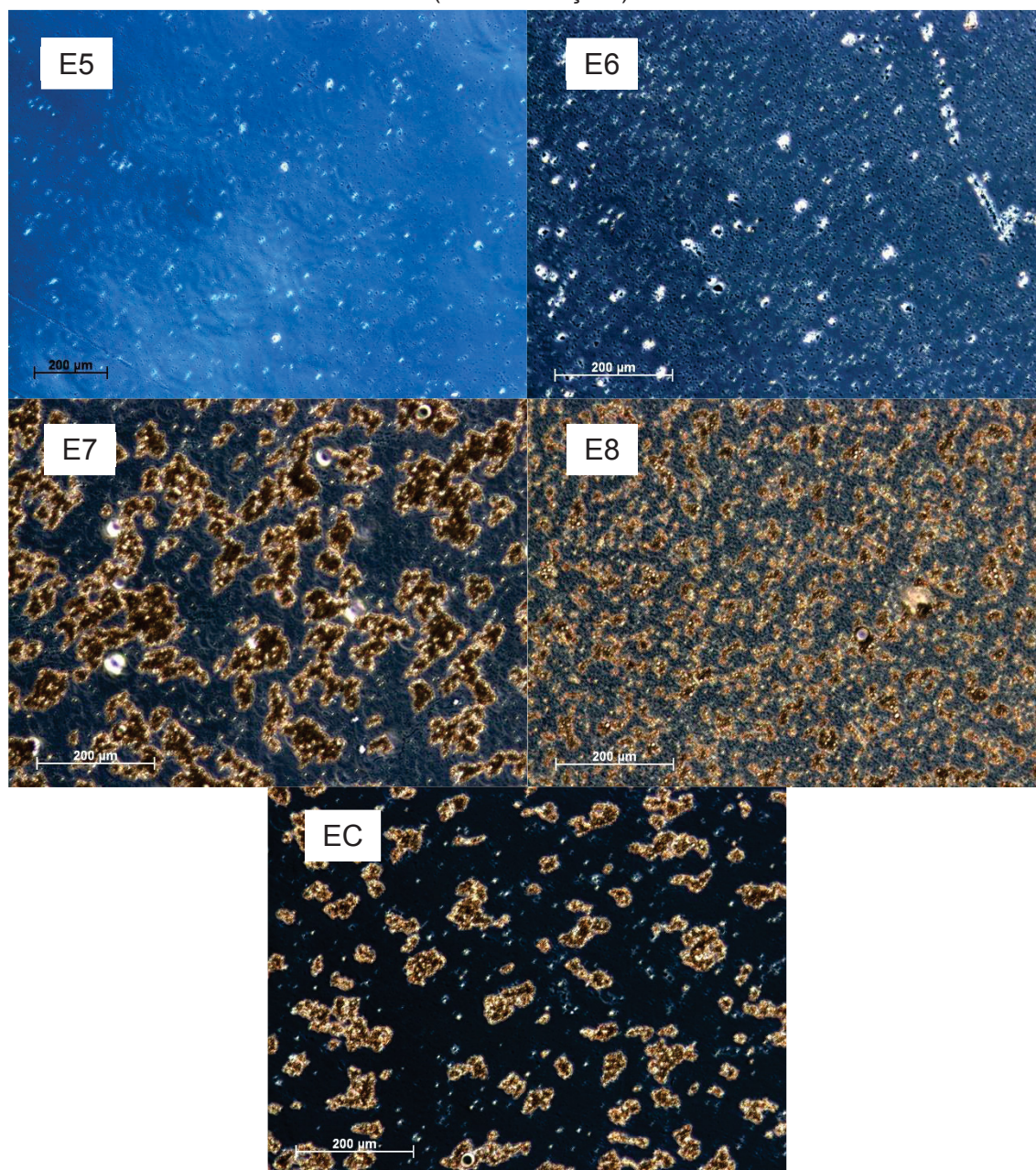
FIGURA 39 – MICROGRAFIAS DAS EMULSÕES, COM PRESENÇA OU NÃO DE ALGINATO, OBTIDAS COM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (AUMENTO DE 160x).



LEGENDA: E1: 1,0% OE; 0,0% NaAlg; 1,0% T80; 15.000 rpm; 2,0 min;  
 E2: 10,0% OE; 0,0% NaAlg; 1,0% T80; 5.000 rpm; 1,0 min;  
 E3: 1,0% OE; 2,5% NaAlg; 1,0% T80; 5.000 rpm; 2,0 min;  
 E4: 10,0% OE; 2,5% NaAlg; 1,0% T80; 15.000 rpm; 1,0 min.



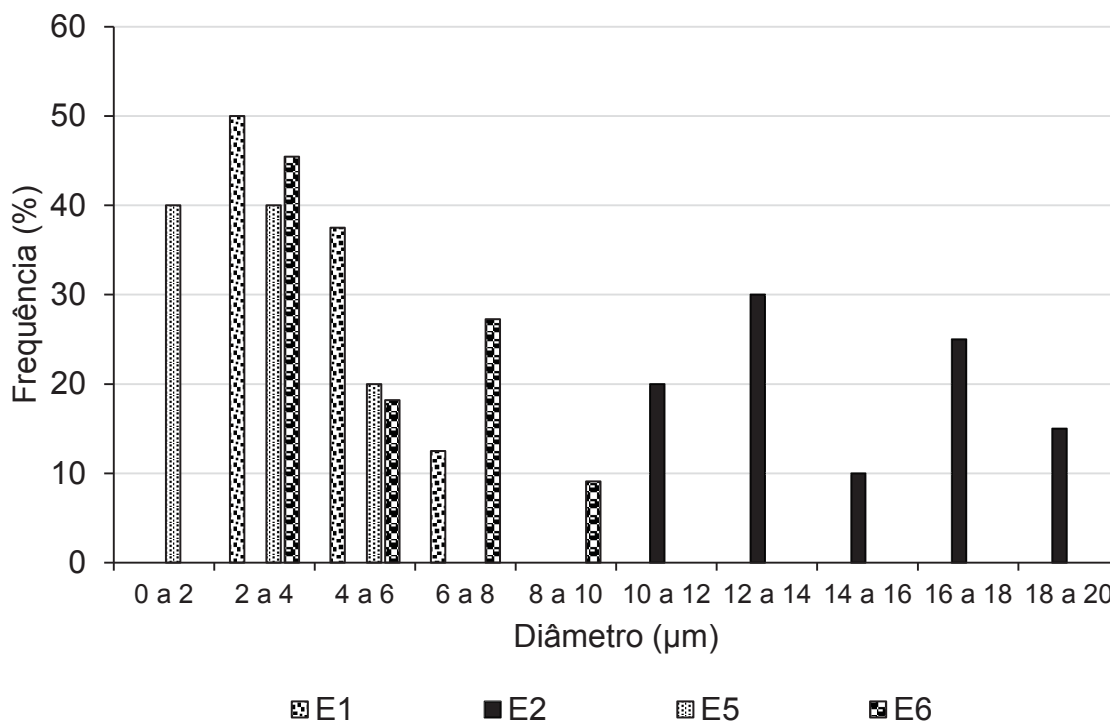
FIGURA 39 – MICROGRAFIAS DAS EMULSÕES, COM PRESENÇA OU NÃO DE ALGINATO, OBTIDAS COM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (AUMENTO DE 160x) (CONTINUAÇÃO).



LEGENDA:	E5:	1,0% OE;	0,0% NaAlg;	2,0% T80;	15.000 rpm;	1,0 min;
	E6:	10,0% OE;	0,0% NaAlg;	2,0% T80;	5.000 rpm;	2,0 min;
	E7:	1,0% OE;	2,5% NaAlg;	2,0% T80;	5.000 rpm;	1,0 min;
	E8:	10,0% OE;	2,5% NaAlg;	2,0% T80;	15.000 rpm;	2,0 min;
	EC:	5,5% OE;	1,25% NaAlg;	1,5% T80;	10.000 rpm;	1,5 min.

As amostras contendo alginato de sódio (E3, E4, E7, E8 e EC) apresentaram aglomerações, possivelmente pela sua associação com o óleo essencial. Nestas condições, a tomada de medidas dos tamanhos de gotas não foi confiável. Para as amostras que não continham NaAlg, a distribuição do tamanho de gota foi a seguinte (FIGURA 40):

FIGURA 40 - EFEITO DA CONDIÇÃO DE EMULSIFICAÇÃO SEM ADIÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO NA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE GOTAS DAS EMULSÕES.



LEGENDA: E1: 1,0% OE; 0,0% NaAlg; 1,0% T80; 15.000 rpm; 2,0 min;  
 E2: 10,0% OE; 0,0% NaAlg; 1,0% T80; 5.000 rpm; 1,0 min;  
 E5: 1,0% OE; 0,0% NaAlg; 2,0% T80; 15.000 rpm; 1,0 min;  
 E6: 10,0% OE; 0,0% NaAlg; 2,0% T80; 5.000 rpm; 2,0 min;

As emulsões E1 e E5, contendo menor teor de OE (1%) e maior velocidade de homogeneização (15.000 rpm), obtiveram menor tamanho de gota, sendo que a amostra com maior adição de T80 (E5, FIGURA 40) obteve a maior concentração de pequenas gotículas (até 6 µm). Para as emulsões E2 e E6, contendo 10% de OE e menor agitação (5.000 rpm), a que foi adicionada de menor quantidade de T80 (E2) apresentou maiores gotículas em suspensão, de 10 a 20 µm.

A princípio, menores proporções de OE e maiores concentrações de T80 seriam favoráveis à homogeneização, sendo tais parâmetros verificados também quanto à estabilidade das amostras (item 4.3.2).

#### 4.3.2 Estabilidade das emulsões formadas

O IC (%) foi usado para avaliar a estabilidade da emulsão criada, sendo que quanto maior IC, maior estabilidade da emulsão (TABELA 21).

TABELA 21 - ÍNDICE DE CREMEAÇÃO AO FINAL DE 7 DIAS PARA PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2<sup>5-2</sup>.

	OE (%)	NaAlg (%)	T80 (%)	R (rpm)	t <sub>e</sub> (min)	IC ± dp <sub>CI</sub> <sup>2</sup>
<b>E1</b>	1,00 (-1)	0,00 (-1)	1,00 (-1)	15.000 (+1)	2,0 (+1)	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>E2</b>	10,00 (+1)	0,00 (-1)	1,00 (-1)	5.000 (-1)	1,0 (-1)	17,7 ± 0,4 <sup>b</sup>
<b>E3</b>	1,00 (-1)	2,50 (+1)	1,00 (-1)	5.000 (-1)	2,0 (+1)	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>E4</b>	10,00 (+1)	2,50 (+1)	1,00 (-1)	15.000 (+1)	1,0 (-1)	60,0 ± 0,7 <sup>c</sup>
<b>E5</b>	1,00 (-1)	0,00 (-1)	2,00 (+1)	15.000 (+1)	1,0 (-1)	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>E6</b>	10,00 (+1)	0,00 (-1)	2,00 (+1)	5.000 (-1)	2,0 (+1)	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>E7</b>	1,00 (-1)	2,50 (+1)	2,00 (+1)	5.000 (-1)	1,0 (-1)	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>E8</b>	10,00 (+1)	2,50 (+1)	2,00 (+1)	15.000 (+1)	2,0 (+1)	64,0 ± 3,3 <sup>c</sup>
<b>EC (ii)<sup>1</sup></b>	5,50 (0)	1,25 (0)	1,50 (0)	10.000 (0)	1,5 (0)	20,7 ± 0,4 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Ponto central, triplicatas. <sup>2</sup> Índice de cremação ao final do sétimo dia ± desvio padrão.

A ANOVA ( $R^2 = 0,9986$ ) revelou que a adição de OE ( $p = 0,000$ ), t ( $p = 0,000$ ), T80 ( $p = 0,000$ ), NaAlg ( $p = 0,020$ ), R ( $p = 0,020$ ) e as interações T80-t ( $p = 0,000$ ), NaAlg-t ( $p = 0,000$ ), NaAlg-T80 ( $p = 0,000$ ) afetaram ( $p < 0,05$ ) a separação de fases para estocagem de 7 dias, sendo que o IC (%) pode ser previsto pela Equação 9, a partir da qual é possível comparar os valores previstos pelo modelo e os observados empiricamente (TABELA 22).

$$\text{IC (\%)} = -47,0329 \cdot \text{OE} - 116,4370 \cdot \text{NaAlg} + 41,1667 \cdot \text{T80} - 0,0382 \cdot \text{R} + 41,1667 \cdot \text{t} - 15,6667 \cdot \text{NaAlg} \cdot \text{T80} - 15,6667 \cdot \text{NaAlg} \cdot \text{t} + 0,0021 \cdot \text{OE} \cdot \text{NaAlg} \cdot \text{R} + 596,7274 \quad (9)$$

TABELA 22 - VALORES PREDITOS E OBSERVADOS PARA IC NO TESTE DE EMULSIFICAÇÃO.

Experimentos	Valores preditos <sup>1</sup>	Valores observados	Desvio-padrão
E1	100,00	100,00	0,00
E2	17,67	17,67	0,00
E3	100,00	100,00	0,00
E4	60,00	60,00	0,00
E5	100,00	100,00	0,00
E6	100,00	100,00	0,00
E7	100,00	100,00	0,00
E8	64,00	64,00	0,00
EC	20,67	20,67	0,00

<sup>1</sup>Valores preditos pelo modelo do planejamento experimental.

A quebra de emulsão para o sétimo dia ocorreu mais intensamente para E2 (17,7%, TABELA 21, FIGURA 41), ou seja, esta foi a emulsão menos estável. Neste caso, há ausência de NaAlg e o T80, R e t estão em menor ordem de grandeza. Isto sugere que quanto maior a grandeza de T80, R e t, maior é a estabilidade. Deste

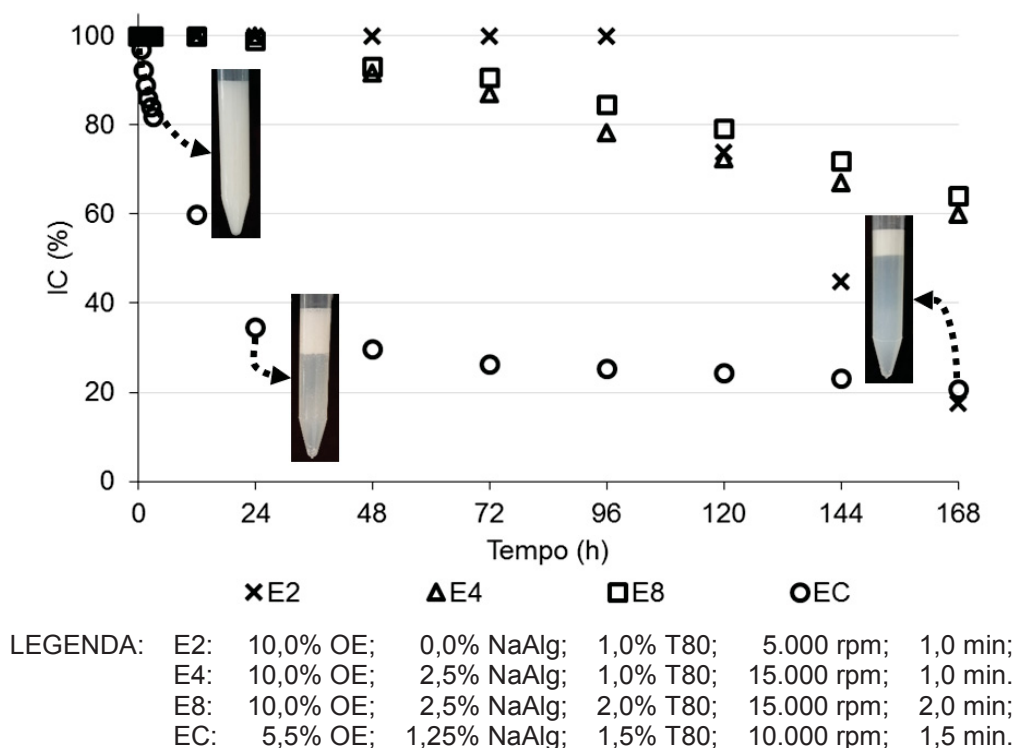
modo, o T80 estabilizaria a interação óleo-água, enquanto que uma maior velocidade de agitação (R) e maior tempo de emulsificação ( $t_e$ ), menor a gotícula e mais estável seria a emulsão. Essa situação foi observada no experimento E8, exceto pela presença de NaAlg (2,50%), o qual demonstra maior estabilidade, mas também não foi absoluta.

Assim, a presença do NaAlg parece provocar um efeito desestabilizador, o que pode ser atribuído a maior afinidade da água pelo NaAlg do que para o sistema OE-T80. O efeito de *salting out* é comum pela adição de agente de interação preferencial, como é o caso do cloreto sódico que destrói a imiscibilidade de água e n-propanol (HASSEINEA; MENIAIB; KORICHIC, 2009). A agitação mais intensa, que aparentemente poderia facilitar a criação das gotículas (unidades de OE emulsionadas), não conseguiu aumentar a estabilidade da emulsão a longo prazo. Neste sentido, a comparação do E4 com E2 confirma a ação deletéria da presença do NaAlg, sendo obtido o mesmo nível de cremeação (60,0%) que o E8 (64,0%) quando aplicado Teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ), apesar de maior velocidade de agitação ( $R = 15.000$  rpm).

Por outro lado, o maior R parece não contribuir para o aumento da estabilidade, mas sim o tempo de emulsificação ( $t_e$ ), como pode ser observado em E6 (IC = 100%). Neste caso, o maior tempo e a maior concentração de T80 permitem a estabilidade absoluta. Por último, o sistema pode ser bastante instável, como observado pela rápida perda de estabilidade para EC nas primeiras 24 h (FIGURA 41). Assim, sua cremeação atinge 60% em apenas 12h. Logo, a otimização deve ser realizada para condição específica de trabalho. Neste sentido, o estudo prévio de esferificação do alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio foi primeiramente realizado para depois serem avaliadas a condição ótima de agitação, tempo de agitação e teor de óleo a ser aplicado de acordo com a posologia definida.



FIGURA 41 - ESTABILIDADE DAS EMULSÕES E2, E4, E8 E EC E ASPECTO VISUAL DO EC.



O planejamento fatorial revelou que o teor de OE (-47,033), de NaAlg (-116,437) e a velocidade de agitação, R (-0,038) afetam negativamente a estabilidade, ao contrário do que foi observado para a adição de T80 (+41,167) e o tempo de homogeneização (+41,167). As superfícies de resposta geradas (dados não mostrados) indicam estabilidade da emulsão plena (100%) a 7 dias de armazenamento para amostras contendo no máximo 2,0% de OE e 0,4% de NaAlg, mínimo de 2,0% de T80, R de 4.000 a 6.000 rpm e t superior a 1,5 min. Tais condições, exceto pelo teor de OE, correspondem à condição E6 (TABELA 5, 10% OE, 0% NaAlg, 2% T80, 5.000 rpm, 2 min), que mesmo contendo 10% de OE não apresentou separação visual de fases no período máximo estudado.

Em geral, para emulsões que terão por finalidade o microencapsulamento, por exemplo, é necessário aplicar maiores valores de NaAlg. Neste caso, tal processo é aconselhado imediatamente após preparo da emulsão.

#### 4.3.3 Comportamento reológico

Como comentado previamente (item 2.6), o comportamento do fluido é de extrema relevância em processos industriais. Deste modo, foram testados os modelos da Lei da Potência (Ostwald-de Waele) e de Bingham para verificar qual melhor se

ajustaria aos dados obtidos para as emulsões do planejamento experimental (TABELA 23):

TABELA 23 - DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO E AJUSTE DOS MODELOS DA LEI DA POTÊNCIA E DE BINGHAM ÀS EMULSÕES OBTIDAS.

Teste	Lei da Potência		Tipo de fluido	Modelo de Bingham	
	k (Pa.sn) <sup>1</sup>	n <sup>2</sup>		$\sigma_0$ (Pa) <sup>3</sup>	$\mu_p$ (Pa.s) <sup>4</sup>
E1	$3,84 \cdot 10^{-4} \pm 1,19 \cdot 10^{-4}$	$1,20 \pm 0,06$	D <sup>5</sup>	$5,32 \cdot 10^{-2} \pm 1,51 \cdot 10^{-2}$	$1,35 \cdot 10^{-3} \pm 6,28 \cdot 10^{-5}$
E2	$3,72 \pm 0,27$	$0,18 \pm 0,01$	P <sup>6</sup>	$1,86 \pm 1,64 \cdot 10^{-2}$	$2,00 \cdot 10^{-3} \pm 9,95 \cdot 10^{-5}$
E3	$0,08 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,03$	D	$1,25 \cdot 10^{-1} \pm 5,15 \cdot 10^{-2}$	$1,02 \cdot 10^{-1} \pm 2,38 \cdot 10^{-3}$
E4	$0,49 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,02$	P	$4,93 \cdot 10^{-1} \pm 4,60 \cdot 10^{-2}$	$2,32 \cdot 10^{-1} \pm 6,56 \cdot 10^{-3}$
E5	$7,22 \cdot 10^{-4} \pm 1,32 \cdot 10^{-4}$	$1,09 \pm 0,03$	D	$2,36 \cdot 10^{-2} \pm 9,49 \cdot 10^{-3}$	$1,26 \cdot 10^{-3} \pm 3,94 \cdot 10^{-5}$
E6	$2,00 \pm 0,08$	$0,05 \pm 0,01$	P	$1,68 \pm 1,29 \cdot 10^{-2}$	$7,04 \cdot 10^{-4} \pm 1,03 \cdot 10^{-4}$
E7	$0,10 \pm 0,01$	$1,05 \pm 0,03$	D	$1,11 \cdot 10^{-1} \pm 6,65 \cdot 10^{-2}$	$1,28 \cdot 10^{-1} \pm 3,65 \cdot 10^{-3}$
E8	$0,57 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,01$	P	$6,54 \cdot 10^{-1} \pm 2,01 \cdot 10^{-2}$	$2,11 \cdot 10^{-1} \pm 2,77 \cdot 10^{-3}$
EC	$0,18 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,05$	P	$7,78 \cdot 10^{-1} \pm 5,24 \cdot 10^{-2}$	$2,06 \cdot 10^{-2} \pm 6,81 \cdot 10^{-4}$
E6m	$0,69 \pm 0,04$	$0,46 \pm 0,03$	P	$7,91 \cdot 10^{-1} \pm 5,31 \cdot 10^{-2}$	$1,31 \cdot 10^{-1} \pm 9,57 \cdot 10^{-3}$

<sup>1</sup>Índice de consistência; <sup>2</sup>Índice de comportamento do fluxo; <sup>3</sup>Tensão de cisalhamento inicial;

<sup>4</sup>Viscosidade plástica. <sup>5</sup>Dilatante. <sup>6</sup>Pseudoplástico.

Em relação à consistência entre dados experimentais e os resultados previstos, verificou-se que os ajustes R<sup>2</sup> das emulsões a cada modelo e a soma dos quadrados dos resíduos (SQR, expressada em %) (TABELA 24), conforme descrito no item 3.4.3.

TABELA 24 – AJUSTE E SQR DA LEI DA POTÊNCIA E DO MODELO DE BINGHAM APLICADOS ÀS EMULSÕES.

Amostra	Lei da potência/ Ostwald-de Waele		Modelo de Bingham		Melhor modelo
	R <sup>2</sup>	SQR (%) <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	SQR (%) <sup>1</sup>	
E1	0,9829	0,42	0,9823	0,43	O <sup>2</sup>
E2	0,9727	2,03	0,9902	1,17	B <sup>3</sup>
E3	0,9935	2,25	0,9930	3,25	O
E4	0,9944	4,02	0,9973	3,88	B
E5	0,9915	0,20	0,9913	0,20	O
E6	0,8927	0,82	0,9193	0,72	B
E7	0,9952	3,45	0,9952	3,48	O
E8	0,9977	1,86	0,9990	1,24	B
EC	0,9730	6,44	0,9935	3,26	B
E6m	0,9738	1,62	0,9993	1,77	B

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação dos modelos aplicados às emulsões. <sup>1</sup>Soma dos quadrados dos resíduos, ou seja, erro/desvio entre dados experimentais e previstos. <sup>2</sup>Ostwald-de Waele. <sup>3</sup>Bingham.

O modelo de Bingham foi o que melhor se adequou às emulsões de característica pseudoplástica, como o esperado, indicando ser necessária uma pequena tensão inicial para escoamento. No caso das emulsões E1, E3, E5 e E7 (todas com 1% de OE), possivelmente em função do comportamento dilatante (TABELA 23) ser próximo ao newtoniano ( $n = 1$ ), a Lei da Potência foi a de melhor ajuste aos dados. Para os índices de comportamento, a ANOVA revelou que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os parâmetros avaliados, embora haja tendência de aumentar o valor de  $n$  próximo a 1 (newtoniano) quanto menor a adição de OE, NaAlg e T80, ou seja, quanto mais pura for a solução aquosa.

De modo geral, a condição E6 ( $n = 0,05 \pm 0,01$ , TABELA 23) foi a de maior característica pseudoplástica ( $n < 1$ ; FERNANDES et al., 2017; NAVARRO et al., 2016). Este comportamento é típico de substâncias que em repouso apresentam as moléculas em um estado desordenado e, quando submetidas a uma tensão de cisalhamento, tendem a se orientar na direção da força aplicada, o que é compatível com o biopolímero linear do alginato de sódio (FIGURA 15). Consequentemente, quanto maior esta força, maior será a ordenação e menor será a viscosidade aparente (RAO, 2007; ZUGE, 2015).

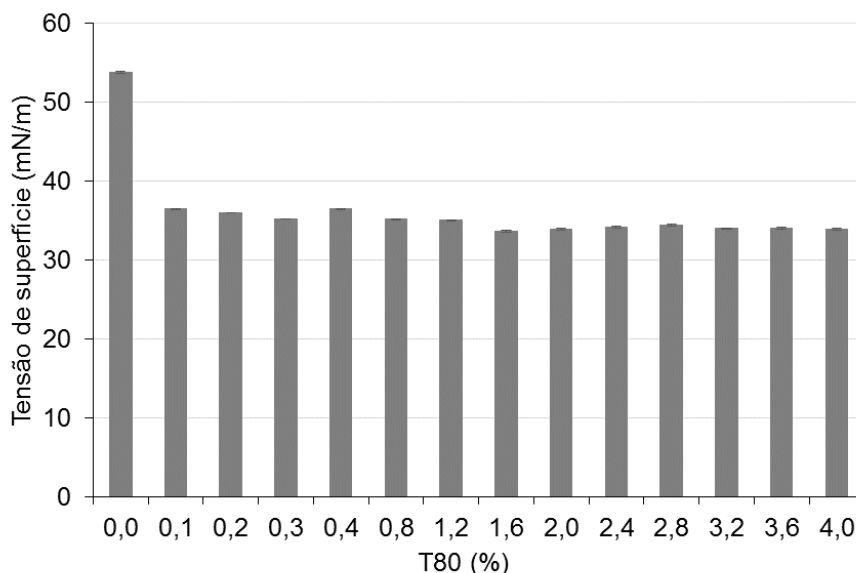
No caso de um processo de microencapsulação por gotejamento, utilizar um fluido pseudoplástico significaria aplicar uma força inicial para começo do gotejamento e uma menor resistência no decorrer do processo, o que facilitaria igualmente processos em maiores escalas. Sendo assim, a condição E6, que era a melhor opção de emulsão pseudoplástica, foi escolhida, mas com adição de alginato de sódio (2,5% m/v) para viabilizar a microencapsulação, a qual se denominou “E6m”. Observa-se que esta condição manteve o comportamento pseudoplástico ( $n = 0,46 \pm 0,03$ , TABELA 23), com necessidade de tensão inicial de escoamento quase nula, motivo pelo qual foi elencada para o teste de tensão superficial (item 4.3.4) para determinar a demanda mínima de T80 e também incluída em estudos posteriores de microencapsulação (item 4.4).

#### 4.3.4 Tensão superficial da emulsão

A tensão superficial da emulsão E6m foi inicialmente aferida de 0,4 em 0,4% (m/v) de adição de T80. Entretanto, houve uma estabilização da tensão frente ao declínio do valor inicial de  $53,78 \pm 0,13$  mN/m para próximo a 36 mN/m (redução

de 32%), mesmo com adições sucessivas de 0,1 em 0,1% (m/v) no intervalo de 0 a 0,4% (m/v). O desvio-padrão dos pontos experimentais são quase imperceptíveis (FIGURA 42).

FIGURA 42 – EFEITO DA ADIÇÃO DE T80 NA TENSÃO SUPERFICIAL DO EXPERIMENTO E6m.



Logo, a baixa adição de T80 (0,1%) testada bastaria para estabilizar a tensão superficial ( $36,42 \pm 0,10$  mN/m), ou seja, já teria atingido a concentração micelar crítica, sem mais interferência do tensoativo/emulsificante na tensão superficial da solução em estudo (BEHRING et al., 2004; SANTOS et al., 2007). Entretanto, verificou-se pelo índice de cremeação das emulsões (item 4.3.2) que quantidade superior a 2% (m/v) deste composto garante maior estabilidade do sistema. Considerando-se a finalidade de emulsificação visando o processo de microencapsulação, optou-se por seguir com concentrações de T80 indicadas no teste de estabilidade, ou seja, 2%.

#### 4.4 MICROENCAPSULAÇÃO COM ALGINATO DE SÓDIO

##### 4.4.1 Testes com emulsões contendo alginato de sódio

Os testes iniciais de microencapsulação (TABELA 6, item 3.5.1) foram aplicados para as emulsões do planejamento experimental contendo alginato de

sódio, para a condição E6m, para a condição ideal de emulsão estável (EI) e para a solução contendo somente alginato de sódio (NaAlg,s, 2,5%).

As esferas de alginato de cálcio sem emulsão (controle, formadas pela NaAlg,s) foram visivelmente distintas, transparentes (FIGURA 43) e bem maiores (TABELA 25) que as demais, como será detalhado posteriormente. Não foi possível formar microcápsulas com uso de baixas concentrações de NaAlg (0,4% para a EI), somente foi gerada uma estrutura irregular com aspecto de filme gelatinoso. Para a E4, as microcápsulas continuaram exsudando umidade após 24 h de secagem (25°C com umidade controlada). As outras amostras contendo 10% de OE (E8 e E6m) apresentaram melhor aspecto visual depois de secas, formato esférico bem definido e sem exsudato. A velocidade de homogeneização, de 15.000 (E8) e 5.000 rpm (E6m), foi o único parâmetro diferente na produção. Neste caso, a condição E6m deve ser adotada, pois usa menor velocidade, evitando termodegradação e proporcionando economia de energia, ou seja, diminuindo custo de processo, em escala industrial.

FIGURA 43 – ASPECTO VISUAL DAS MICROCÁPSULAS ÚMIDAS IMEDIATAMENTE APÓS MICROENCAPSULAÇÃO.



LEGENDA:	E3:	1,0% OE;	2,5% NaAlg;	1,0% T80	5.000 rpm;	2,0 min t <sub>e</sub> ;
	E4:	10,0% OE;	2,5% NaAlg;	1,0% T80	15.000 rpm;	1,0 min t <sub>e</sub> ;
	E7:	1,0% OE;	2,5% NaAlg;	2,0% T80	5.000 rpm;	1,0 min t <sub>e</sub> ;
	E8:	10,0% OE;	2,5% NaAlg;	2,0% T80	15.000 rpm;	2,0 min t <sub>e</sub> ;
	EC:	5,5% OE;	1,25% NaAlg;	1,5% T80	10.000 rpm;	1,5 min t <sub>e</sub> ;
	E6m:	10,0% OE;	2,5% NaAlg;	2,0% T80	5.000 rpm;	2,0 min t <sub>e</sub> ;
	EI:	2,0% OE;	0,4% NaAlg;	2,0% T80;	5.000 rpm;	1,5 min t <sub>e</sub> ;
	Controle (NaAlg,s):	-	2,5% NaAlg.	-	-	-

Sobre o formato das microcápsulas (TABELA 25), uma maior esfericidade indicaria proporções adequadas especialmente de NaAlg e OE, teor de CaCl<sub>2</sub>, altura

de gotejamento e tempo de permanência na solução de  $\text{CaCl}_2$  ( $t_p$ ), sendo estes parâmetros muito utilizados na otimização de processos de microencapsulação (ABANG; CHAN e PONCELET, 2012; CALVO; BUSCH; SANTAGAPITA, 2017; LIU; XU e WANG, 2012; OTÁLORA et al., 2016; YAN et al., 2014). Já a massa da microcápsula úmida ( $m_u$ , TABELA 25) está relacionada ao tempo de homogeneização da emulsão ( $t_p$ ) que é utilizada na produção da partícula, pois não há diferença estatística ( $p \geq 0,05$ ) ao se usar 2,0 min (E3, E8 e E6m), mas sim com 1,0 min (E4 e E7; mas que são também diferentes entre si, devido ao teor de OE).

TABELA 25 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS FORMADAS NOS TESTES PRELIMINARES DE MICROENCAPSULAÇÃO.

Testes	Características das microcápsulas	$m_u^1$ (mg)	$m_s^2$ (mg)	Redução de massa (%)	$D_u^3$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_s^4$ ( $\mu\text{m}$ )	Redução de diâmetro (%)
E3	Branças translúcidas, boa esfericidade	$7,0 \pm 0,1^a$	$0,1 \pm 0,0^a$	$98,1 \pm 0,0^a$	$2461,3 \pm 90,0^a$	$1010,0 \pm 45,8^a$	$58,9 \pm 2,5^a$
E4	Branças opacas, boa esfericidade	$8,5 \pm 0,1^b$	$1,2 \pm 0,0^b$	$86,2 \pm 0,3^b$	$2674,7 \pm 94,6^a$	$1426,3 \pm 79,7^b$	$46,7 \pm 2,4^{bc}$
E7	Branças translúcidas, boa esfericidade	$5,7 \pm 0,2^c$	$0,1 \pm 0,0^a$	$97,9 \pm 0,1^a$	$2328,8 \pm 89,6^{ab}$	$960,0 \pm 52,7^a$	$58,6 \pm 3,3^a$
E8	Branças opacas, boa esfericidade	$6,9 \pm 0,3^a$	$1,1 \pm 0,0^{bc}$	$83,6 \pm 0,9^c$	$2634,3 \pm 51,8^a$	$1395,3 \pm 75,1^b$	$47,0 \pm 2,7^b$
EC	Branças opacas, forma de gota irregular	$4,1 \pm 0,3^d$	$0,2 \pm 0,0^a$	$94,1 \pm 0,4^d$	$2161,1 \pm 228,1^b$	$1020,7 \pm 115,3^a$	$52,0 \pm 7,5^{ac}$
E6m	Branças opacas, boa esfericidade	$7,0 \pm 0,1^a$	$1,0 \pm 0,0^c$	$85,3 \pm 0,8^{bc}$	$2544,4 \pm 112,1^a$	$1302,9 \pm 60,1^b$	$48,7 \pm 2,2^{bc}$
NaAlg,s	Incolores, translúcidas, boa esfericidade	$11,5 \pm 0,2^e$	$0,5 \pm 0,0^d$	$95,4 \pm 0,3^d$	$2981,3 \pm 111,8^c$	$1135,2 \pm 81,8^a$	$61,7 \pm 3,9^a$

<sup>1</sup> Massa das microcápsulas úmidas. <sup>2</sup> Massa das microcápsulas secas. <sup>3</sup> Diâmetro das microcápsulas úmidas. <sup>4</sup> Diâmetro das microcápsulas secas. \*Letras iguais na mesma coluna indicam igualdade estatística pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

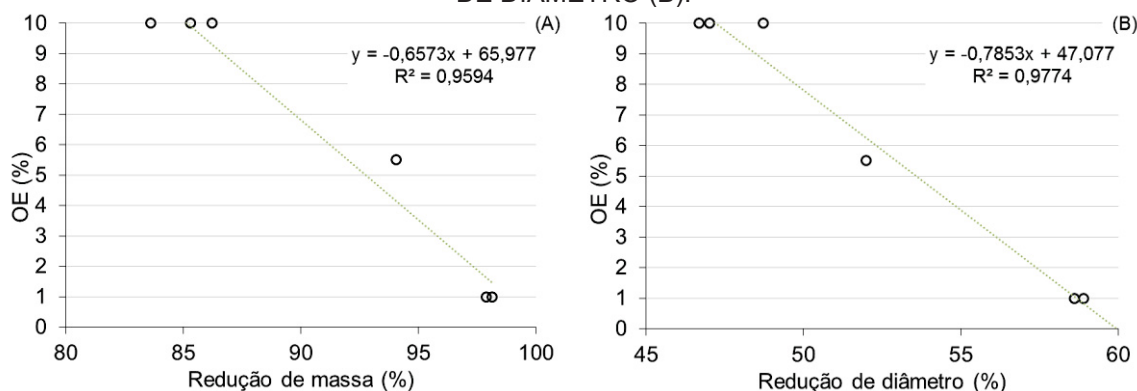
Para a massa seca ( $m_s$ , TABELA 25), os experimentos com maior teor de óleo (10,0%) são similares (E4, E8, E6m); do mesmo modo, são similares entre si os de menor valor de OE (E3 e E7). O EC não apresentou diferença estatística com esses dois últimos, o que pode ser atribuído ao valor levemente superior de óleo (5,5%) e menor valor de alginato (1,25%). Assim, a matéria seca foi compensada para este



caso específico. A maior redução de massa (~98%) pela secagem ocorreu para microcápsulas (E3 e E7) com menor teor de óleo (1%), enquanto que a menor redução (~84%) ocorreu para maiores teores de OE (10%). Neste caso, há dois subgrupos, E4 e E6m ou E6m e E8, sendo que E4 (~86%) apresenta menor teor de T80 e menor tempo de homogeneização do que o E8 (~84%). Apesar das diferenças estatísticas, os valores são muito próximos.

O diâmetro médio (D), admitindo esferas perfeitas, foi muito maior (TABELA 25) para as microcápsulas úmidas de alginato (controle, NaAlg,s). As microcápsulas úmidas com aditivos e com mesmo teor de alginato (2,5%; E3, E4, E7 e E8 e E6m) não apresentaram diferença estatística. O experimento EC apresentou o menor diâmetro, sendo estatisticamente igual ao E7; o que pode ser atribuído aos fatores de tempo e velocidade de agitação durante a produção da microcápsula. Os diâmetros das microcápsulas secas foram menores para as amostras com menores teores de óleo (E3, E7, EC), as quais não apresentaram diferença em relação as de controle (NaAlg,s), o que pode ser atribuído a menor quantidade de matriz de alginato/OE que formam a estrutura de matéria seca. Neste sentido, as que têm 10% de OE em sua composição são maiores e similares ( $p \geq 0.05$ ) entre si. A redução de diâmetro (TABELA 25) das microcápsulas com 1,0% de óleo e 2,5% de NaAlg (E3 e E7) são similares ao experimento central (EC), que possui metade do teor de óleo (5,5%) e NaAlg (1,25%). As microcápsulas com maiores teores de óleo (10,0%) tiveram menor redução de tamanho (47-49%) do que as anteriores (59-62%). Isto foi confirmado pelo alto coeficiente de determinação para sua correlação (FIGURA 44). Assim, esses dados confirmam a hipótese de que a matéria não aquosa é responsável pela estrutura final.

FIGURA 44 - RELAÇÃO ENTRE TEOR DE OE (%) COM REDUÇÃO DE MASSA (A) E REDUÇÃO DE DIÂMETRO (B).





A massa que compõe as microcápsulas foi calculada (TABELA 26), não sendo considerada a contribuição do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , pois não havia dados de sua reação complexométrica. O teor de matéria seca obtida foi levemente superior à teórica para as condições com 10% de OE (E4, E8, E6m). As partículas com 1% (E3 = 42%, E7 = 38%) apresentaram massas bem inferiores ao valor teórico, seguidas pelas com 5,5% (EC = 71%) de OE. Isto sugere que é um processo imprevisível, devido a biovariabilidade do alginato entre outros fatores, e dependente da adição do OE de anis estrelado. O mesmo não pode ser afirmado para o T80.

TABELA 26 - COMPARAÇÃO ENTRE MASSA TEÓRICA SEM UMIDADE (g/100g) E MASSA RESIDUAL DAS MICROCÁPSULAS SECAS (g/g100g).

Ensaio	OE (%) <sup>1</sup>	NaAlg (%) <sup>2</sup>	T80 (%) <sup>3</sup>	Massa teórica sem umidade (g/100g)	Massa residual média após desidratação (g/100g)	Teor de sólidos (%)
E3	1,0	2,5	1,0	4,5	1,9 ± 0,0	42
E4	10,0	2,5	1,0	13,5	13,8 ± 0,3	102
E7	1,0	2,5	2,0	5,5	2,1 ± 0,1	38
E8	10,0	2,5	2,0	14,5	16,4 ± 0,9	113
EC	5,5	1,3	1,5	8,3	5,9 ± 0,4	71
E6m	10,0	2,5	2,0	14,5	14,7 ± 0,8	101
NaAlg,s	0,0	2,5	0,0	2,0	4,6 ± 0,3	43

<sup>1</sup>Óleo essencial de anis-estrelado. <sup>2</sup>Alginato de sódio. <sup>3</sup>Emulsificante Tween 80.

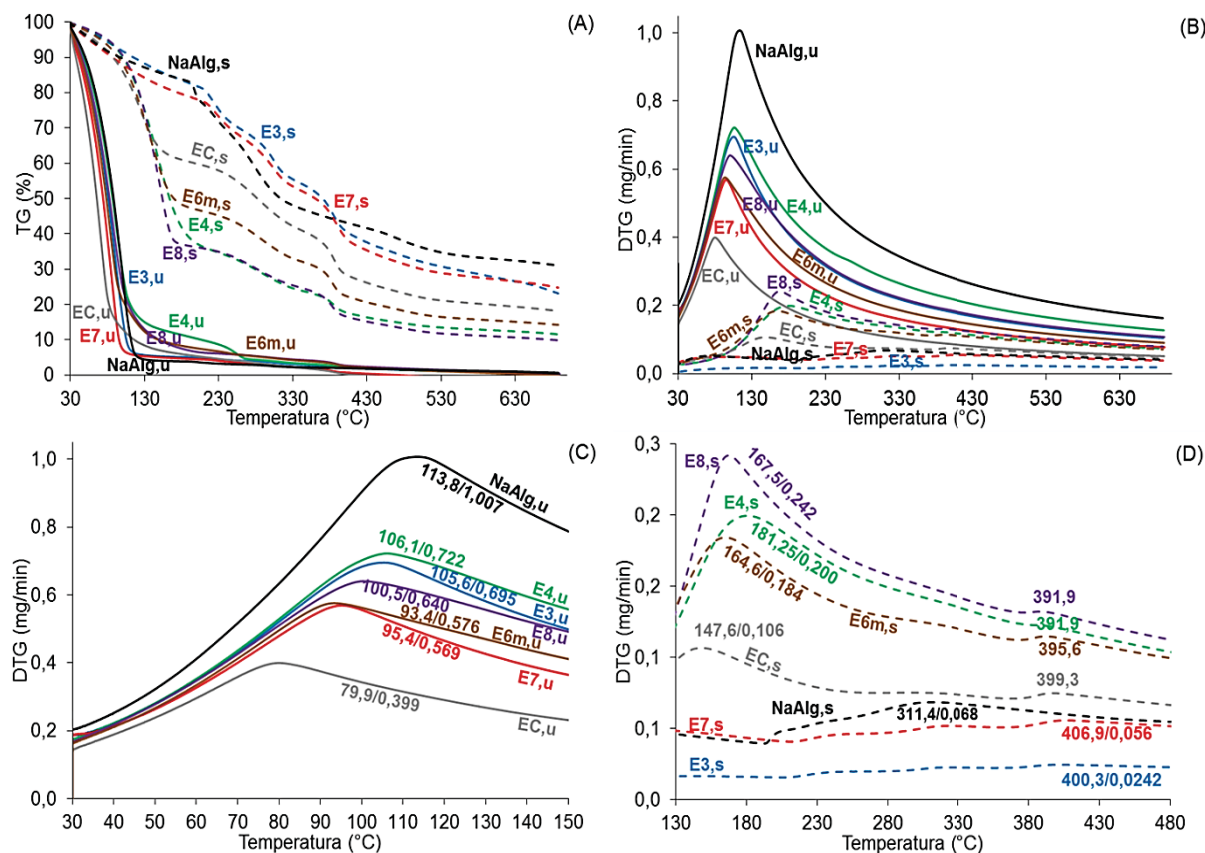
Os perfis de desidratação (temperatura ambiente a 150°C) de microcápsulas úmidas (u) e de termodegradação (130 a 700°C) das microcápsulas secas (s) foram determinados para todas as condições de produção estudadas (TABELA 27), onde observa-se similaridade de comportamento entre amostras secas contendo mesmo teor de OE.

TABELA 27 – TEMPERATURAS E DERIVADAS DOS PICOS TERMOGRAVIMÉTRICOS DAS MICROCÁPSULAS.

Microcápsulas (OE/NaAlg/T80)	Úmidas (u)			Secas (s)		
	T <sub>máx</sub> (°C)	Pico DTG (mg/min)	$\Delta m_{\text{RT-150}}$ (%)	T <sub>máx</sub> (°C)	Pico DTG (mg/min)	$\Delta m_{130-630}$ (%)
E3 (1,0/2,5/1,0)	105,6	0,695	94,3	400,3	0,024	11,8
E4 (10,0/2,5/1,0)	106,1	0,722	85,0	181,3	0,200	24,9
E7 (1,0/2,5/2,0)	95,4	0,569	94,7	406,9	0,056	15,8
E8 (10,0/2,5/2,0)	100,5	0,640	87,0	167,5	0,242	25,1
EC(5,5/1,25/1,5)	79,9	0,399	91,6	147,6	0,107	27,7
E6m (10,0/2,5/2,0)	93,4	0,576	87,7	164,6	0,184	27,5
NaAlg,s (-/2,5/-)	113,8	1,007	95,5	311,4	0,068	12,8

As curvas da análise termogravimétrica para microcápsulas úmidas (u) e secas (s) (TG, FIGURA 45, A) e suas derivadas (DTG, FIGURA 45, B, TABELA 27) ficaram claramente distintas para as condições de hidratação das partículas. Para melhor visualização dos dados obtidos por DTG, os perfis de desidratação de microcápsulas úmidas (u) foram apresentados também da temperatura ambiente a 150°C (FIGURA 45, C) e os perfis de termodegradação de secas (s) de 130 a 480°C (FIGURA 45, D) foram determinados para todas as condições de produção estudadas (TABELA 27). A desidratação das partículas de NaAlg úmidas (NaAlg,u) revelou maior pico de velocidade (DTG, 1,007 mg/min, TABELA 27) e maior temperatura máxima ( $T_{\text{máx}}$ , 113,8°C) do que as  $T_{\text{máx}}$  das partículas com aditivo (FIGURA 45). Um pico de DTG superior pode ser atribuído ao maior diâmetro deste tipo de microcápsula (TABELA 25), bem como a não interferências de aditivos na difusão das moléculas de água. Partículas com maiores teores de T80 (E7, E8 e E6m) apresentaram menores valores de  $T_{\text{máx}}$  do que as com menos T80 (E3 e E4) (TABELA 27). As partículas EC, com valor intermediário de T80, revelaram o menor valor de  $T_{\text{máx}}$ , o que confirma a complexidade do sistema (hidrogel). A presença do T80 facilita a difusão da água de porções mais internas, a qual poderia ser perturbada pela presença de óleo. Isto pode ser verificado com o pequeno acréscimo de valor de  $T_{\text{máx}}$  para o par E3-E4 (1 e 10% OE, respectivamente) em comparação com o par E7-E8. No caso EC, o uso da metade do teor de NaAlg, que produz partículas menores (TABELA 25), também tem a difusão facilitada da água pela menor massa de sólidos (TABELA 26) de camada protetora de alginato de cálcio (CaAlg). Adicionalmente, o subgrupo com maior perda de umidade (E3, E7 e NaAlg) também tem menor teor de água residual após desidratação, do que o outro (E4, E8 e E6m), o que pode ser atribuído também a uma interação de retenção de massa de água na matriz de sólidos. Logo, cria um efeito limitante de perda de água e, mais uma vez, o comportamento de EC (condições intermediárias) confirma esta hipótese.

FIGURA 45- CURVAS DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E SUAS DERIVADAS PARA MICROCÁPSULAS ÚMIDAS E SECAS.



LEGENDA: (A) TG para todas as amostras, úmidas e secas;  
 (B) DTG para todas as amostras, úmidas e secas;  
 (C) DTG com principais eventos para microcápsulas úmidas de 30 a 150°C;  
 (D) DTG com principais eventos para microcápsulas secas de 130 a 480°C

A termodegradação das microcápsulas secas (s) (FIGURA 45, D) apresentou dois picos (entre 147,6-180,4°C e 391,9-406,9°C). As  $T_{máx}$  das microcápsulas de NaAlg aditivadas ocorreram em valores distintos de seus componentes individuais: OE (147,7°C, TABELA 28 e item 4.1.2), T80 (435,4°C, TABELA 28) ou alginato de sódio em pó (250,6°C, TABELA 28). A  $T_{máx}$  das microcápsulas desidratadas da condição EC (147,6°C, TABELA 27) foi similar à previamente relatada para o OE (147,7°C).

TABELA 28 - TEMPERATURAS E DERIVADAS DOS PICOS TERMOGRAVIMÉTRICOS DOS COMPONENTES PUROS E DA EMULSÃO E6m.

Componentes	$T_{máx}$ (°C)	Pico DTG (mg/min)
OE <sup>1</sup>	147,7	0,161
NaAlg P.A em pó <sup>2</sup>	250,6	1,487
T80 <sup>3</sup>	435,4	0,131
Emulsão E6m	76,2/133,4	0,589/0,440

<sup>1</sup>Óleo essencial de anis-estrelado. <sup>2</sup>Alginato de sódio. <sup>3</sup>Emulsificante Tween 80.

As derivadas das condições experimentais E4, E8 e E6m secas (todas com 10% OE) foram as maiores e suas  $T_{\text{máx}}$  também foram superiores (181,3, 167,5, 164,6°C respectivamente) à  $T_{\text{máx}}$  do OE (147,7°C, TABELA 28). Ainda, a  $T_{\text{máx}}$  do E6m foi muito próxima à do E8 (FIGURA 45, D), mas ambas são relativamente menores que a E4, que contém metade de T80. Logo, a adição de emulsificante pode ser relevante neste aspecto e deve ser estudada a posteriori. Na condição antagônica de carga de OE (apenas 1%), não foi detectada perda significativa de massa, ou seja, parece que o OE ficou totalmente retido na matriz. Isto sugere que a matriz de geleificação protege o óleo (como observado para E3 e E7, com  $T_{\text{máx}}$  maior, FIGURA 45) da ação térmica, mas não impede seu desprendimento no caso de uma adição elevada (10% ao invés de 1%). Esta hipótese foi confirmada pela similaridade da DTG da hidrosfera de NaAlg (FIGURA 45, D).

Assim, as microcápsulas úmidas apresentaram somente a perda de água quando submetidas ao aumento de temperatura, enquanto as desidratadas promovem proteção do composto bioativo até temperatura aproximada de 150°C. Isto revela que, mesmo uma desidratação com aquecimento a temperaturas brandas, não causaria perda significativa do trans-anetol, o que condiz com o estudado previamente no item 4.1.2, em que uma temperatura de 60°C havia sido estabelecida como limite para aquecimento de amostras contendo TA.

#### 4.4.2 Otimização da microencapsulação

Aplicando-se Delineamento composto central rotacional (DCCR) para emulsão E6m, foram obtidos 10 ensaios de otimização (TABELA 29), dos quais foram calculadas as eficiências de encapsulação (EE, %) de acordo com o item 3.5.2.

TABELA 29 – EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO (EE, %).

Ensaios	Enc. 1	Enc. 2	Enc. 3	Enc. 4	Enc. 5	Enc. 6	Enc. 7	Enc. 8	Enc. C (i) <sup>3</sup>	Enc. C (1)	Enc. C (2)
<b>CaCl<sub>2</sub>(%)<sup>1</sup></b>	1,5	1,5	2,5	2,5	1,3	2,7	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
<b>t<sub>p</sub> (min)<sup>2</sup></b>	1,0	30,0	1,0	30,0	15,5	15,5	-5,0 <sup>4</sup>	36,0 <sup>5</sup>	15,5	15,5	15,5
<b>EE (%)</b>	72,0	72,6	77,6	63,7	62,7	51,4	0,0	71,9	96,6	95,5	97,6

<sup>1</sup>Cloreto de cálcio adicionado à solução salina de maturação. <sup>2</sup>Tempo de permanência/maturação das microcápsulas na solução salina. <sup>3</sup>Ponto central, em duplicata, i = 1-2. <sup>4</sup>Considerado como zero min.

<sup>5</sup>Arredondado para 36 min.

Os dados de EE (TABELA 29) foram utilizados com variável de resposta e submetidos a análise ANOVA, que revelou baixo valor de correlação ( $R^2 = 0,5644$ ) e

com valores “p” indicando não haver diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os parâmetros estudados. Pela superfície de resposta (dados não mostrados), a região ótima englobaria os parâmetros do ponto central (Enc. C), ou seja, uma solução salina contendo 2,0% de  $\text{CaCl}_2$  e um tempo de permanência/maturação das microcápsulas em 15,5 min, obtendo um EE experimental de 96,6%.

Além disto, esta eficiência da encapsulação para a melhor condição avaliada (Enc. C) foi muito superior aos relatados para complexação de trans-anetol (TA) puro (TABELA 30), associado a vários tipos de ciclodextrina e liofilizado (KFOURY et al., 2014). Isto pode ser atribuído à diferença de operação unitária de encapsulação. No caso do uso de emprego de *spray drying*, com uso destinado a aplicação de aromas, e não ao uso terapêutico em específico, o óleo essencial de anis-estrelado (5%), associado a maltodextrina (20%) e proteína de soja (7,5%), teve uma eficiência de encapsulação de 92% (WANG et al., 2014), ou seja, apenas 5% menor que o obtido no presente estudo. Isto revela que pode ser uma técnica selecionada, mas que pode implicar numa diferente efetividade na liberação dirigida.

Não foram encontrados relatos de metodologias de microencapsulação de OE via gelificação por gotejamento. Mesmo assim, a eficiência de encapsulação relatada no presente trabalho foi muito superior às encontradas para óleo de laranja doce em solução de alginato de sódio (2,5%) gotejada sob solução de  $\text{CaCl}_2$  (2%) (LIU; XU; WANG, 2012) e óleo de fígado de tubarão em quitosana/alginato de cálcio (PENICHE et al., 2004). Foi superior também às microencapsulações realizadas por *spray drying*, com óleo de farelo de arroz (GUPTA; JADHAV; SINGHAL, 2015), corante vermelho de beterraba (KAIMAINEN et al., 2015), óleo de hortelã (KOO et al., 2014), betalaínas de figo-da-Índia púrpura (OTÁLORA et al., 2015), óleo de melaleuca (ZHANG et al., 2017) e óleo de peixe (TAN; CHAN; HENG, 2009).

TABELA 30 – COMPARAÇÃO DA MÉDIA DO PONTO Enc. C DO PRESENTE ESTUDO COM OUTROS ESTUDOS DE ENCAPSULAÇÃO.

Compostos testados	EE (%)	Superior à referência (%)	Referência
Enc. C (OE com NaAlg e maturação em CaCl <sub>2</sub> )	97	Usado como referência	Presente trabalho
TA em $\alpha$ -ciclodextrina, liofilizado	25	288	KFOURY et al. (2014)
TA em $\beta$ -ciclodextrina, liofilizado	17	471	
TA em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), liofilizado	25	288	
TA em $\beta$ -ciclodextrina metilada aleatoriamente (RAMEB), liofilizado	34	185	
TA em $\beta$ -ciclodextrina de baixa metilação (CRYSMEB), liofilizado	27	259	
Óleo essencial de anis-estrelado (5%) usando maltodextrina (20%) e proteína de soja (7,5%) e encapsulado por <i>spray drying</i>	92	5	WANG et al. (2014)
Óleo de laranja doce em solução de alginato de sódio (2,5%) gotejada sob solução de CaCl <sub>2</sub> (2%)	86	13	LIU; XU; WANG (2012)
Óleo de farelo de arroz encapsulado por <i>spray drying</i> usando maltodextrina (biopolímero sem atividade de superfície)	35	177	GUPTA; JADHAV; SINGHAL (2015)
Corante vermelho de beterraba em solução aquosa contendo goma guar e goma xantana	89	9	KAIMAINEN et al. (2015)
Óleo de hortelã, <i>spray drying</i> usando maltodextrina	85	14	KOO et al. (2014)
Betalainas (BE) de figo-da-Índia púrpura ( <i>Opuntia ficus-indica</i> ) encapsulado por <i>spray drying</i> usando maltodextrina DE 20 (MD) e mucilagem de cladódios (MC)	25 (BE:MD:MC) 16 (BE:MD)	282 491	OTÁLORA et al. (2015)
Óleo de melaleuca com quitosana/alginato encapsulado por <i>spray drying</i>	89	9	ZHANG et al. (2017)
Óleo de fígado de tubarão em quitosana/alginato de cálcio por gelificação ionotrópica	87	11	PENICHE et al. (2004)
Óleo de peixe com alginato/amido encapsulado por <i>spray drying</i>	57 77	70 26	TAN; CHAN; HENG (2009)

O ponto central (Enc. C), obtido a partir de emulsão contendo 10% OE, 2,5% NaAlg, 2,0% T80, 5.000 rpm de agitação por 2 min e gotejada sob solução salina contendo 2,0%  $\text{CaCl}_2$  em um tempo de maturação de 15,5 min, apresentou maior valor de EE, se situou dentro da região ótima esperada pelo planejamento (dados não mostrados) e supera os valores de EE para outras matrizes citadas em literatura. Por isto, foi utilizada para os testes seguintes.

Para os diâmetros médios das microcápsulas úmidas (TABELA 31), não foi observada relação direta entre diâmetro, concentração de  $\text{CaCl}_2$  da solução salina e tempo de maturação.

TABELA 31 – DIÂMETRO MÉDIO DAS MICROCÁPSULAS DO TESTE DE OTIMIZAÇÃO DCCR.

Ensaio	$\text{CaCl}_2$ (%) <sup>1</sup>	$t_p$ (min) <sup>2</sup>	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	Desvio-padrão ( $\mu\text{m}$ )	Desvio (%)
Enc.1	1,5	1,0	2626,8 <sup>a</sup>	71,4	2,7
Enc.2	1,5	30,0	2601,1 <sup>a</sup>	116,4	4,5
Enc.3	2,5	1,0	2036,2 <sup>b</sup>	42,1	2,1
Enc.4	2,5	30,0	1832,1 <sup>c</sup>	62,9	3,4
Enc.5	1,2929	15,5	2383,7 <sup>d</sup>	122,2	5,1
Enc.6	2,7071	15,5	2341,9 <sup>d</sup>	101,8	4,3
Enc.7	2,0	-5,0061 <sup>4</sup>	0	0	0
Enc.8	2,0	36,0061 <sup>5</sup>	2627,9 <sup>a</sup>	124,6	4,7
Enc.C (1)	2	15,5	2790,9 <sup>a</sup>	122,8	4,4
Enc.C (2)	2	15,5	2755,1 <sup>a</sup>	136,3	4,9
Enc.C (i) <sup>3</sup>	2	15,5	2773,0 <sup>a</sup>	129,5	4,7

\*Letras iguais na mesma coluna indicam igualdade estatística pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ). <sup>1</sup>Cloreto de cálcio adicionado à solução salina de maturação. <sup>2</sup>Tempo de permanência/maturação das microcápsulas na solução salina. <sup>3</sup>Média do ponto central, em duplicata,  $i = 1-2$ . <sup>4</sup>Considerado como zero min. <sup>5</sup>Arredondado para 36 min.

## 4.5 ANÁLISES DAS PARTÍCULAS FORMADAS

### 4.5.1 Testes de secagem

Os testes de secagem das microcápsulas no ponto ótimo de encapsulação (Enc.C) resultaram em uma massa residual de  $14,71 \pm 0,82\%$  para as amostras desidratadas a  $25^\circ\text{C}$  ( $S_{25^\circ\text{C}}$ , TABELA 32), valor aproximadamente 1,45% acima do teórico de 14,5%, considerando as massas de OE, NaAlg e T80 adicionados à emulsão, indicando que provavelmente houve retenção do composto bioativo de interesse e ainda um residual de umidade. Para os demais testes de secagem, a  $42,5^\circ\text{C}$  ( $S_{42,5^\circ\text{C}}$ ),  $60^\circ\text{C}$  ( $S_{60^\circ\text{C}}$ ) e para amostras liofilizadas ( $S_{\text{LIO}}$ ), houve diferença de



53,81%, 53,82% e 54,93% em relação à massa teórica, indicando que um aumento de temperatura e a secagem por liofilização podem promover maior perda de trans-anetol da microcápsula.

TABELA 32 – MASSA RESIDUAL E REDUÇÃO DE MASSA DAS MICROCÁPSULAS SUBMETIDAS A DIFERENTES TIPOS DE SECAGEM.

Teste	Massa residual (%)	Redução de massa (%)	Diferença em relação à massa teórica (%)
S <sub>25°C</sub>	14,71 ± 0,82 <sup>a</sup>	87,57 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,45
S <sub>42,5°C</sub>	6,70 ± 0,05 <sup>b</sup>	93,30 ± 0,05 <sup>b</sup>	53,81
S <sub>60°C</sub>	6,70 ± 0,23 <sup>b</sup>	93,30 ± 0,23 <sup>b</sup>	53,82
S <sub>LIO</sub>	6,53 ± 0,05 <sup>b</sup>	93,47 ± 0,05 <sup>b</sup>	54,93
Massa teórica <sup>1</sup>	14,5 <sup>c</sup>	85,5 <sup>c</sup>	-

<sup>1</sup>Massa teórica considerando os valores de OE, NaAlg e T80 adicionados à emulsão. \*Letras iguais na mesma coluna indicam igualdade estatística pelo teste de Tukey (p≥0,05).

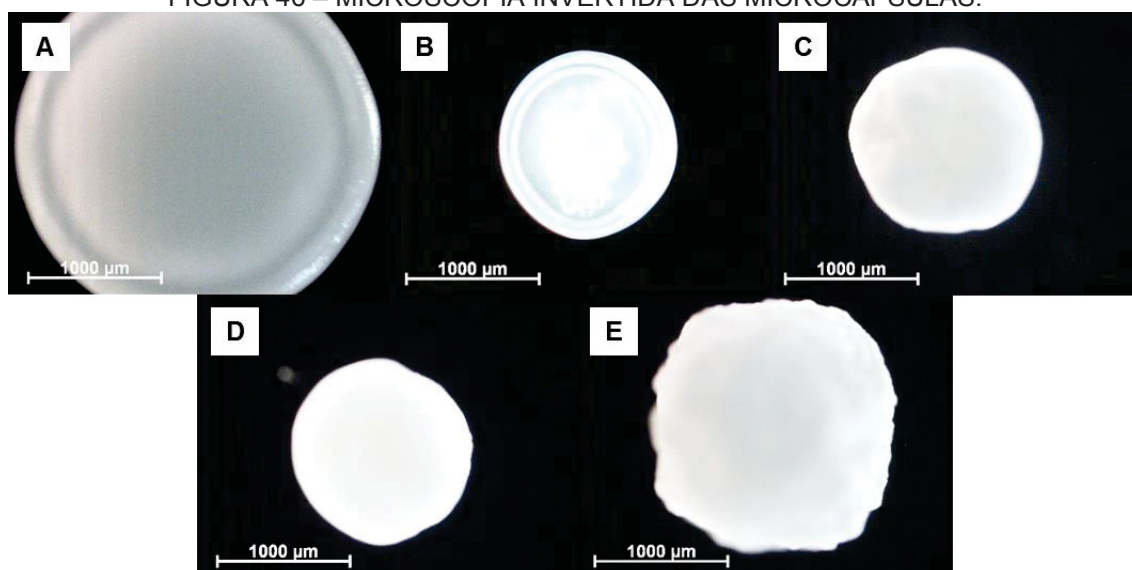
O tamanho das microcápsulas foi também analisado, para verificar se haveria diferenças em função das condições de desidratação.

#### 4.5.2 Morfologia das microcápsulas úmidas e secas

##### 4.5.2.1 Avaliação visual das microcápsulas por microscopia invertida

Os diâmetros médios das microcápsulas úmidas sofreram redução significativa (FIGURA 46, TABELA 33) quando secas em estufa a diferentes temperaturas. O diâmetro das amostras S<sub>25°C</sub>, S<sub>42,5°C</sub> e S<sub>60°C</sub> (1360 µm) não diferiram estatisticamente entre si, mas sim da desidratação por liofilização (S<sub>LIO</sub>, 1790 µm). Isto pode ser explicado pelo fato de que as amostras liofilizadas, devido à sublimação, não estão submetidas ao processo de encolhimento de forma tão expressiva quanto às demais amostras (KOÇ; EREN; ERTEKIN, 2008).

FIGURA 46 – MICROSCOPIA INVERTIDA DAS MICROCÁPSULAS.



LEGENDA: (A) Microcápsula do ponto Enc.C, úmida;  
 (B) Microcápsula do ponto Enc.C, seca a 25°C;  
 (C) Microcápsula do ponto Enc.C, seca a 42,5°C;  
 (D) Microcápsula do ponto Enc.C, seca a 60°C;  
 (E) Microcápsula do ponto Enc.C, liofilizada.

TABELA 33 – DIÂMETRO MÉDIO DAS MICROCÁPSULAS ANTES DA SECAGEM E APÓS DIFERENTES TIPOS DE DESIDRATAÇÃO.

Testes	Diâmetro médio (µm)
Enc. C <sup>1</sup>	2773,0 ± 129,5 <sup>a</sup>
S <sub>25°C</sub>	1332,5 ± 65,2 <sup>b</sup>
S <sub>42,5°C</sub>	1346,9 ± 65,5 <sup>b</sup>
S <sub>60°C</sub>	1369,1 ± 58,9 <sup>b</sup>
S <sub>LIO</sub>	1789,5 ± 62,3 <sup>c</sup>

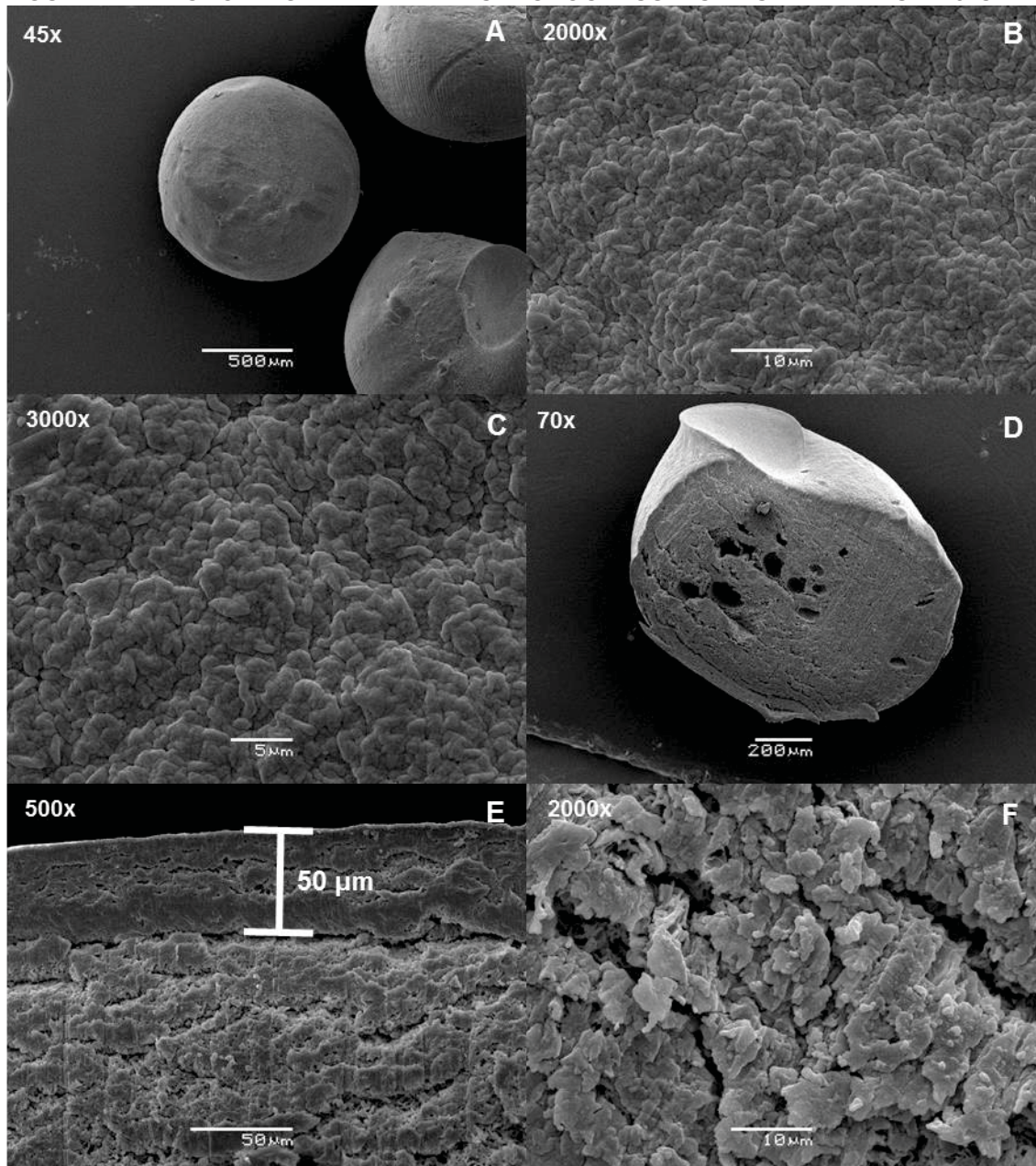
<sup>1</sup>Amostras úmidas.

A fim de verificar se a superfície das microcápsulas estavam íntegras, promovendo uma maior proteção do composto bioativo, tal qual como sugerido por DELADINO et al. (2008), as amostras foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura.

#### 4.5.2.2 Avaliação visual da microcápsula por microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) da amostra desidratada a 25°C (FIGURA 47) indicou revestimento homogêneo da microcápsula, sem porosidades e com camada superficial de espessura constante (50 µm) no decorrer da amostra.

FIGURA 47 – MICROIMAGEM DE MEV DAS MICROCÁPSULAS DESIDRATADAS A 25°C/24h.

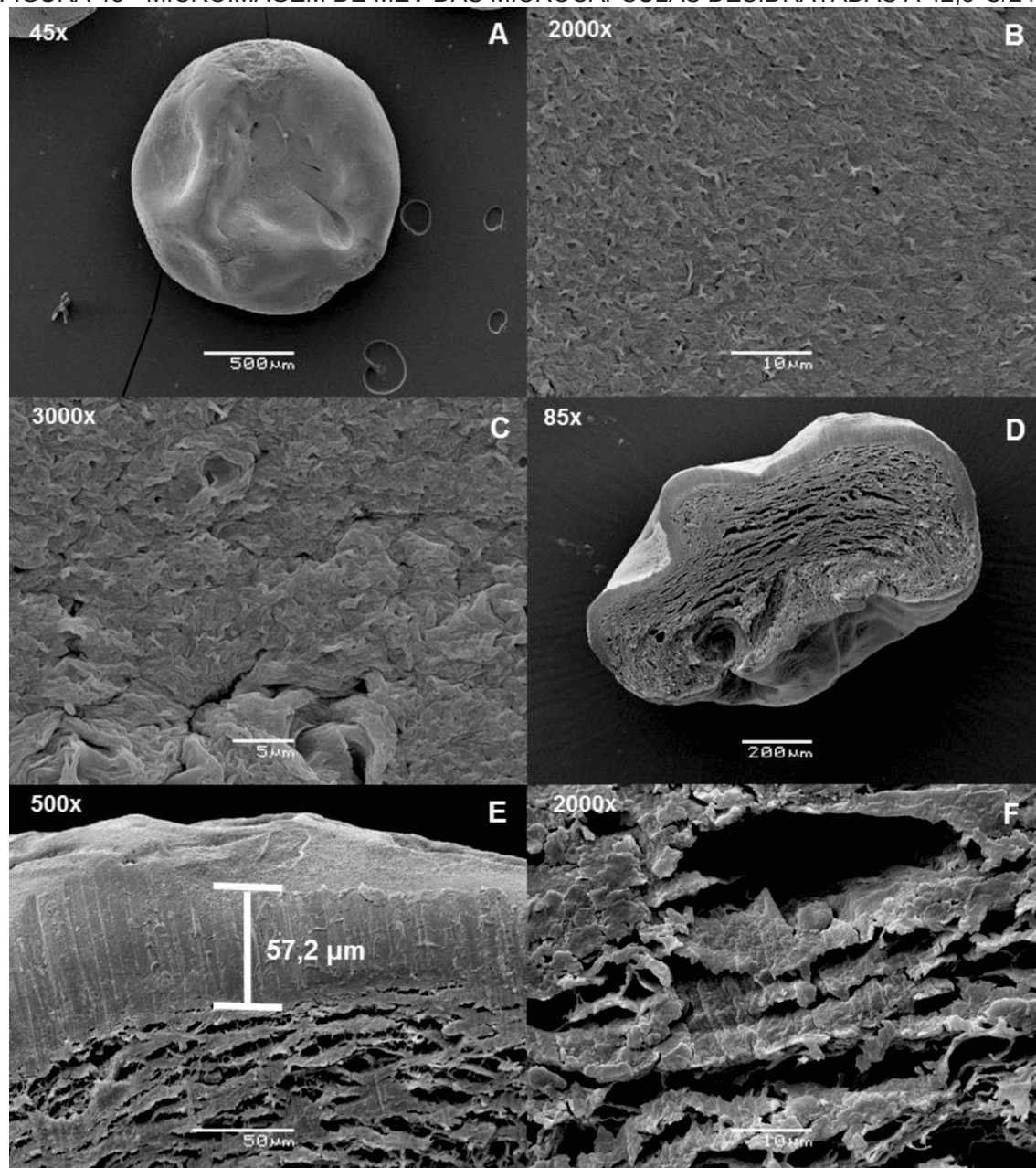


A secagem a 42,5°C resultou em microcápsulas de maiores concavidades e com porosidades perceptíveis aos aumentos de 2000x e 3000 x (FIGURA 48). O interior apresentou formação de algumas cavidades, possivelmente em função da



pressão interna exercida pela umidade ao evaporar. A espessura média da superfície foi de 57,2  $\mu\text{m}$ , porém variando dentre as demais localizações da amostra.

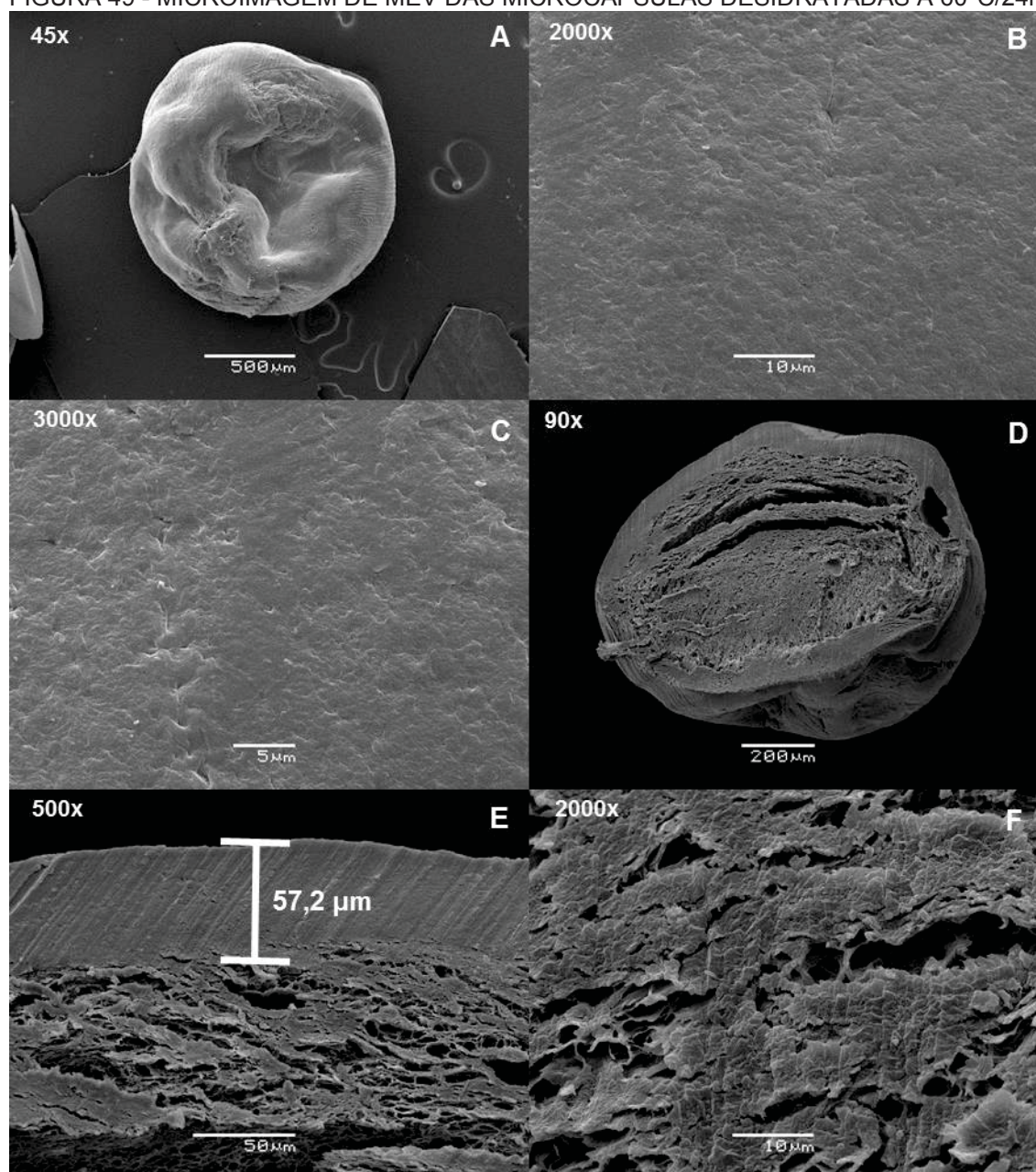
FIGURA 48 - MICROIMAGEM DE MEV DAS MICROCÁPSULAS DESIDRATADAS A 42,5°C/24h.



Para a secagem a 60°C, foram percebidas fissuras na superfície das microcápsulas (FIGURA 49, 45x), interior com aparência quebradiça e espessura média de 57,2  $\mu\text{m}$ .



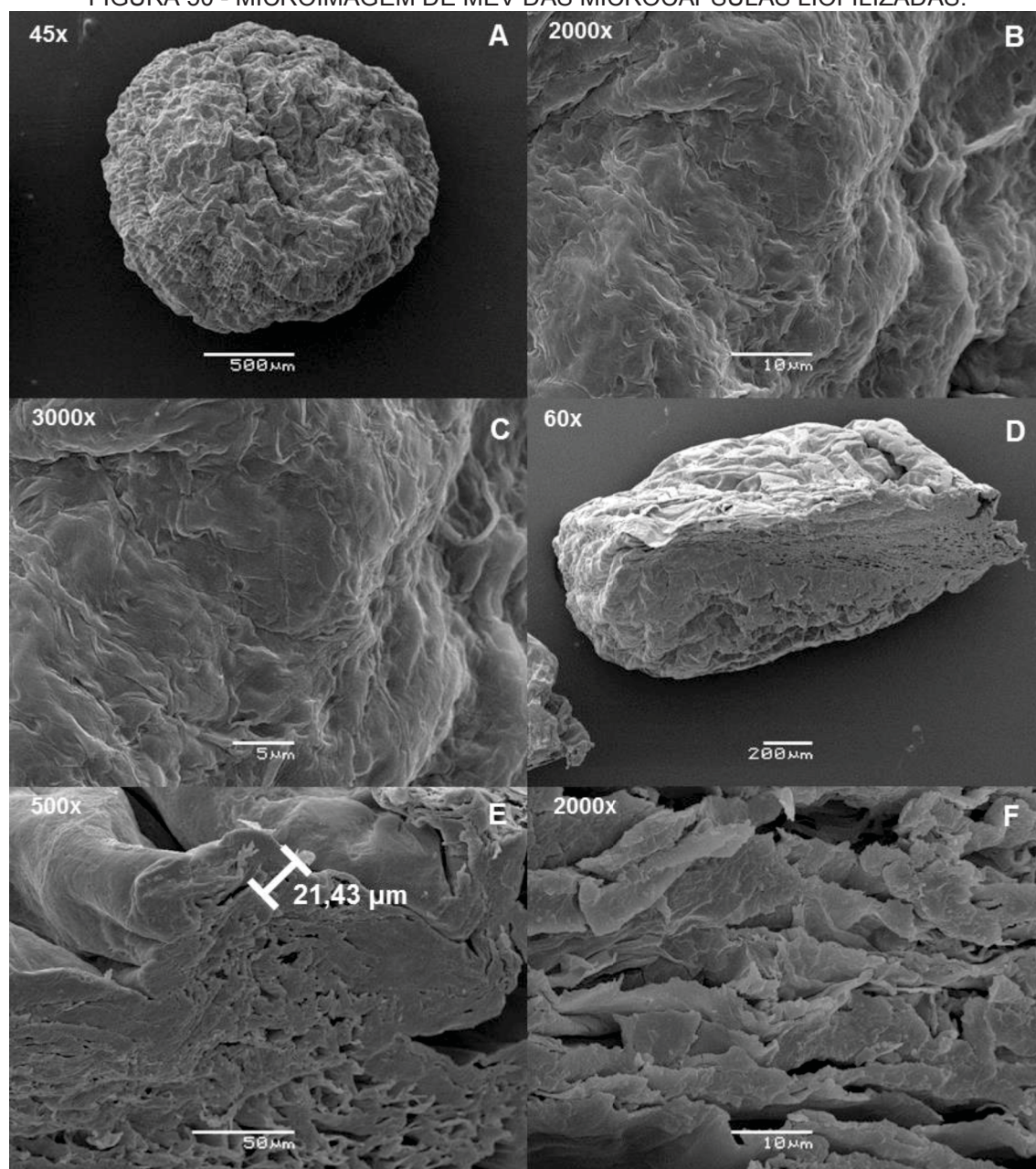
FIGURA 49 - MICROIMAGEM DE MEV DAS MICROCÁPSULAS DESIDRATADAS A 60°C/24h.



As amostras liofilizadas (FIGURA 50) apresentaram superfície bastante irregular, com muitas cavidades e fendas (aumento de 45x) e interior bastante quebradiço e esponjoso, possivelmente em função da pressão exercida pelo material originalmente líquido ao sublimar durante o processo. Tal porosidade maior das amostras liofilizadas em relação à secagem convencional a ar já havia sido relatada por Koç; Eren e Ertekin (2008) e Krokida e Maroulis (1997). As microcápsulas S<sub>LIO</sub> também apresentaram maior diâmetro quando comparadas às S<sub>25°C</sub>, S<sub>42,5°C</sub> e S<sub>60°C</sub>, já não sofrem encolhimento tão drástico (KOÇ; EREN; ERTEKIN, 2008), conforme comentado anteriormente.



FIGURA 50 - MICROIMAGEM DE MEV DAS MICROCÁPSULAS LIOFILIZADAS.



Além da possível sublimação da água, formando cavidades, foi realizado experimento complementar somente com padrão de TA, no qual observou-se grande perda de composto bioativo no processo de liofilização, de  $95,8 \pm 0,1\%$ . Apesar do processo de microencapsulação ter a função de proteger o conteúdo de evaporação e oxidação (KOO et al., 2014; RAVICHANDRAN et al., 2014; WANG et al., 2016), o processo de liofilização pode prejudicar sua finalidade.

De acordo com DELADINO et al. (2008), o teste MEV permite verificar a integridade do revestimento de alginato de cálcio (superfície sem formação de cavidades/poros), uma vez que evita a perda de composto bioativo volátil e sua

oxidação durante armazenamento. Deste modo, as amostras desidratadas a 25°C/24 h em ambiente de umidade controlada apresentaram a melhor conformação de superfície das demais, a princípio com maior proteção do composto bioativo, e com menor gasto de energia de processo, o que impactaria positivamente o processo industrial.

#### 4.6 CINÉTICA DA LIBERAÇÃO DE TRANS-ANETOL EM AMBIENTE DE pH GASTROINTESTINAL – TESTE *IN VITRO*

O perfil de liberação de TA em ambientes simulando a acidez estomacal foi estimado com base na concentração teórica total de TA ( $C_{TA,t}$ ) e a quantidade total de TA, em mg, no volume de alíquota (20  $\mu$ L), correspondente a 0,18 mg ( $TA_A$ , mg) (TABELA 34).

TABELA 34 – CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DE TA NO VOLUME AMOSTRADO.

Massa microcápsulas desidratadas (mg)	Teor de TA (mg) <sup>1</sup>	V solução (mL) <sup>2</sup>	$C_{TA}$ (mg/mL) <sup>3</sup>	$TA_A$ (mg) <sup>4</sup>
400	271,92	30	9,06	0,18

<sup>1</sup>Considerando que as microcápsulas desidratadas contêm 14,71% de massa residual quando comparadas às úmidas; 85,29% água evaporada. <sup>2</sup>Volume de solução no frasco reacional.

<sup>3</sup>Concentração teórica total de TA. <sup>4</sup>Quantidade total de TA na alíquota amostral de 20  $\mu$ L.

Sabendo-se a massa inicial de TA inicial teórico no volume amostral ( $TA_A$ , 0,18 mg/20  $\mu$ L) e com os valores de massa de TA calculados por curva espectrofotométrica para cada tempo de amostragem ( $t_c$ ), em cada pH ( $TA_{-pH}$ ) (TABELA 35, FIGURA 51), foram calculadas as porcentagens de liberação ( $L_{TA-pH}$ , %) em função ao  $C_{TA,t}$ .

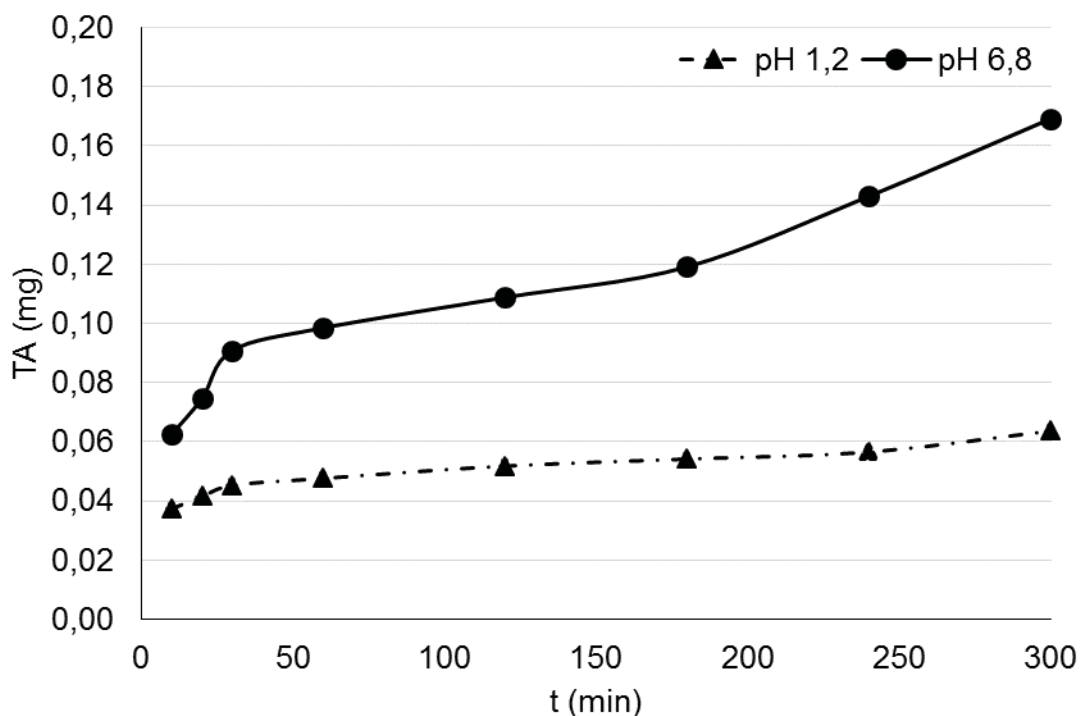
TABELA 35 – LIBERAÇÃO DE TA PARA pHs 1,2 E 6,8 NOS TEMPOS DE AMOSTRAGEM.

$t_c$ (min)	$TA_A$ (mg) <sup>1</sup>	$TA_{-1,2}$ (mg) <sup>2</sup>	$L_{TA-1,2}$ (%) <sup>3</sup>	$TA_{-6,8}$ (mg) <sup>4</sup>	$L_{TA-6,8}$ (%) <sup>5</sup>
10	0,181	$0,037 \pm 2,36 \cdot 10^{-3}$	20,65	$0,062 \pm 2,06 \cdot 10^{-3}$	34,46
20	0,181	$0,042 \pm 1,18 \cdot 10^{-3}$	22,92	$0,075 \pm 4,72 \cdot 10^{-3}$	41,13
30	0,181	$0,045 \pm 2,95 \cdot 10^{-4}$	25,03	$0,091 \pm 2,95 \cdot 10^{-4}$	50,07
60	0,181	$0,048 \pm 8,84 \cdot 10^{-4}$	26,33	$0,098 \pm 3,24 \cdot 10^{-3}$	54,29
120	0,181	$0,052 \pm 1,47 \cdot 10^{-3}$	28,61	$0,109 \pm 0,00$	59,98
180	0,181	$0,054 \pm 8,84 \cdot 10^{-4}$	29,91	$0,119 \pm 5,01 \cdot 10^{-3}$	65,67
240	0,181	$0,057 \pm 8,84 \cdot 10^{-4}$	31,21	$0,143 \pm 6,48 \cdot 10^{-3}$	78,84
300	0,181	$0,064 \pm 8,84 \cdot 10^{-4}$	35,11	$0,169 \pm 3,83 \cdot 10^{-3}$	93,31

<sup>1</sup>Massa total de TA no volume amostral de 20  $\mu$ L. <sup>2</sup>TA liberado no pH 1,2. <sup>3</sup>Porcentagem de liberação de TA (%) em relação ao  $TA_A$  no pH 1,2. <sup>4</sup>TA liberado no pH 6,8. <sup>5</sup>Porcentagem de liberação de TA (%) em relação ao  $TA_A$  no pH 6,8.



FIGURA 51 – QUANTIDADE DE TA LIBERADO NOS MEIOS SIMULADOS DE pH 1,2 E 6,8.



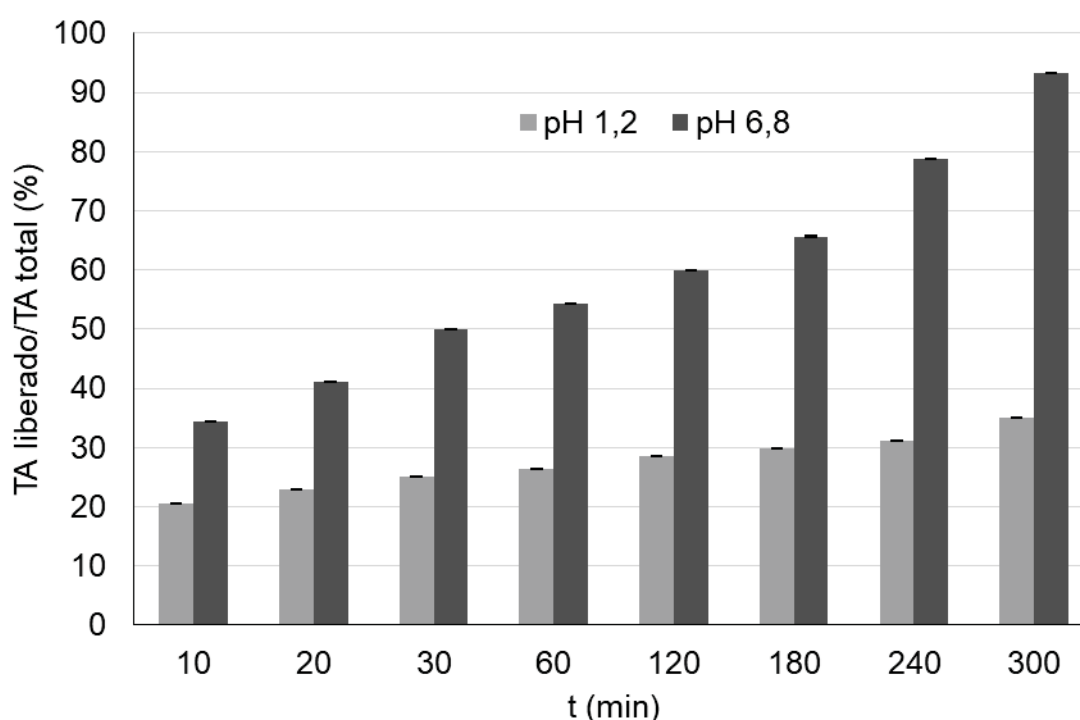
As porcentagens de liberação de TA no sistema com solução de pH 1,2 tendem a se estabilizar após 30min (FIGURA 52), com valor aproximado de 25% neste período, e atingindo 35% após 300 min (5h) de análise. Como o período médio de permanência de alimentos sólidos no ambiente estomacal é de uma hora e trinta e cinco minutos (1h35min) (GRAFT; BRINCH; MADSEN, 2001), a liberação seria de 27%. Para pH intestinal, a liberação de TA seguiu crescimento praticamente linear durante toda o estudo (FIGURA 52), atingindo valor final de 93%. Considerando tempo de permanência de três horas e cinquenta e cinco minutos (3h55min) para ambiente intestinal, a liberação seria de 79%. O perfil de liberação de acordo com o pH possivelmente está relacionado ao ponto isoelétrico dos ácidos  $\beta$ -D-manurônico ( $pK_a = 3,38$ ) e  $\alpha$ -L-gulurônico ( $pK_a = 3,65$ ), como citado previamente (item 2.7): em um pH inferior ao  $pK_a$  dos constituintes ocorre incorporação de prótons e o polímero tende a se insolubilizar, protegendo o fármaco. No entanto, em acidez acima dos  $pK_a$ , ocorre liberação do composto ativo pela solubilização do alginato (CENDON, 2014; WILSON; CROWLEY, 2011).

Esta maior liberação no trato intestinal seria benéfica, uma vez que o TA é reconhecidamente melhor absorvido por esta mucosa (FRITSCH; BLANQUAT; DERACHE, 1975). Testes em roedores Wistar demonstraram que a administração de TA por perfusão *in situ*, via cateter, apresentaram uma absorção gástrica de 42% em

90 min (tempo similar ao de permanência de material sólido no estômago humano, de 95 min) e intestinal de 76% para 120 min, o tempo máximo de duração do experimento, metade do estimado para tempo de liberação em intestino humano (235 min). Mesmo assim, a absorção intestinal foi superior a 80% do que a estomacal (FRITSCH; BLANQUAT; DERACHE, 1975).

Deste modo, a liberação de TA no intestino permitiria menor degradação do composto bioativo até que sua absorção ocorresse.

FIGURA 52 – PORCENTAGEM DE LIBERAÇÃO DE TA NOS MEIOS SIMULADOS DE pH 1,2 E 6,8.



Com estas porcentagens de liberação nos tempos de permanência gastrointestinal e sabendo-se a quantidade de 400 mg de microcápsulas adicionadas a 30 mL de cada meio simulado, para pH 1,2 seriam liberados 74,70 mg de TA (TABELA 36). No caso do pH 6,8, esta quantidade seria de 214,39 mg.

TABELA 36 – QUANTIDADE DE TA LIBERADO A PARTIR DE 400 mg DE MICROCÁPSULAS.

Condição	Massa microcápsulas (mg)	Liberação de TA (mg)
pH 1,2	400	74,70
pH 6,8	400	214,39

Para ingestão de TA, conforme relatado no item 2.3, o relatório TRS 891-JECFA 51/18 aprovado pelo Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos

Alimentares (*The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA*) reporta que o trans-anetol como aromatizante alimentar não apresenta risco à saúde humana até uma ingestão diária de 2 mg/kg de peso corporal (WHO/IPCS\_INCHEM, 2018). Com isto, a nível de exemplificação, foram calculadas as ingestões diárias máximas de segurança para uma pessoa de 60 kg e outra de 80 kg (TABELA 37).

TABELA 37 – INGESTÃO DIÁRIA SEGURA PARA INGESTÃO DE MICROCÁPSULAS, COM BASE NOS TESTES *IN VITRO*.

Massa corpórea (kg)	pH 1,2 -TA (mg)	Massa microcápsulas (mg)	pH 6,8 - TA (mg)	Massa microcápsulas (mg)
60	120	642,53	120	223,89
80	160	856,71	160	298,52

Estima-se, então, que para uma pessoa de 60 kg e considerando o meio de maior liberação (pH 6,8), a ingestão máxima diária seria de 223,89 mg de microcápsulas secas (TABELA 37). Para uma pessoa de 80 kg, este valor subiria para 298,52 mg para uma dosagem segura.

Obviamente, testes futuros considerando a liberação conjunta em meio gástrico e intestinal, experimentos em meios simulados contendo enzimas e ensaios *in vivo*, promoverão uma aproximação mais real do perfil de liberação no organismo humano.

De modo geral, os dados obtidos até o momento permitem supor a viabilidade da aplicação terapêutica do trans-anetol via oral por microcápsulas desidratadas nas condições otimizadas de hidrodestilação, emulsificação, microencapsulação e secagem. Isto permitiria, portanto, dar prosseguimento mais detalhado aos estudos quanto ao uso de trans-anetol no tratamento de mal de Alzheimer (em função da inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase) e mesmo quanto aos efeitos anticarcinogênicos em função da administração de trans-anetol nas células intestinais, citados por Bhadra et al. (2011) e Asif et al. (2016), respectivamente. Tal administração possivelmente ocorreria pela ingestão de microcápsulas desidratadas comercializadas na forma de sachês.

## 5 CONCLUSÃO

O fruto desidratado anis-estrelado chinês deve ser cuidadosamente selecionado para não ser confundido com seu homônimo japonês, que é tóxico. Seu teor de umidade deve ser determinado em analisador infravermelho a 60°C para evitar resultados falso-positivos, em função da perda de material volátil. Além disto, a matéria-prima deve ser preferencialmente armazenada sob refrigeração até seu processamento, a fim de evitar possíveis contaminações microbiológicas e perdas de compostos voláteis.

A produção do OE, sendo predominantemente trans-anetol, por hidrodestilação demanda a fragmentação dos frutos secos. Eles apresentam estruturas que são mais recalcitrantes à fragmentação do que outras. A fração recalcitrante apresenta menor teor relativo de OE, o que faz com que suas remoagens sucessivas não sejam convenientes. No entanto, como as frações maiores correspondem às sementes, estas não seriam descartadas, mas sim destinadas à produção do remédio antiviral Tamiflu®, de grande valor comercial.

O rendimento de OE obtido por hidrodestilação em escala laboratorial é afetado positivamente com uso de partículas pequenas ( $<425\ \mu\text{m}$ ), 200 mL de volume de água destilada, alta relação entre partículas e água (16%) e tempos de hidrodestilação longos (3h), resultando em 10,8 g OE/100 g frutos secos. No entanto, uma alta produtividade de OE (10,2 g OE/100 g bs.h) com alta pureza de trans-anetol (96,6% TA) ocorreu nos primeiros momentos (1h) e com 8% de massa de fruto seco.

Sobre as metodologias de identificação do óleo essencial, o índice de refração e as análises termogravimétricas confirmam o tipo de óleo, porém a comestibilidade das amostras deve conciliar a análise visual e a cromatografia gasosa acoplada à massa, sendo que esta é também capaz de caracterizar sua composição.

A capacidade antioxidante é afetada positivamente com o uso de menor granulometria da matéria-prima e um maior tempo de extração e volume de água na hidrodestilação, sendo a condição HD5 ( $G < 425\ \mu\text{m}$ , m 8%, 3h, 500 mL) a de maior capacidade. Essa otimização deve ser realizada em projeção de *scale-up*, sendo que se espera a mesma relação de importância e para os mesmos parâmetros. O experimento HD5 possui menor teor de TA (82,2%). Assim, a capacidade antioxidante não pode ser atribuída exclusivamente ao trans-anetol, sendo que há possivelmente um efeito sinérgico com outros componentes. No entanto, D-limoneno e estragol, que

estão presentes no óleo, não revelaram resultados conclusivos, necessitando de estudos complementares. Das metodologias usadas para estimar a capacidade antioxidante (CFT, FRAP, ABTS e DPPH), o teste DPPH foi a metodologia mais apropriada para a sua avaliação industrial, embora a metodologia ABTS apresente maior ajuste ( $R_{\text{modelo, ABTS}}^2 = 0,9533$ ), mas com reação secundária com os micropoços de análise, o que pode ter influenciado na resposta analítica em termos de melhor correlação.

A compatibilização de interação do OE e a da solução aquosa de alginato demanda a criação de uma emulsão que deve ser estável até seu uso. As soluções a 25°C são mais estáveis por até 7 dias quando se usa menores quantidades de OE (2,0%) e NaAlg (0,4%), maiores T80 (2,0%) e tempo de agitação (1,5 min) e baixa velocidade de agitação (5.000 rpm). A adição de NaAlg pode desestabilizar o sistema a ser microencapsulado, mas deve usada entre 2 e 3% para viabilizar o microencapsulamento. Neste caso, a emulsão deve ser usada imediatamente em relação a seu preparo a fim de garantir homogeneidade do sistema. Do mesmo modo, a concentração de OE deve ser a maior possível para se atingir a posologia, o que reduz o tempo de espera para iniciar a esferificação. Assim, a condição com adição de alginato adequada, E6m (10,0% OE, 2,5% NaAlg, 2,0% T80, 5.000 rpm por 2 min), apresentou ótima esferificação, além de reduzir custos operacionais, especialmente em escala industrial, quando comparado à que usa maior velocidade de homogeneização (E8, 15.000 rpm).

A microencapsulação deve ser realizada com 10% OE, 2,5% NaAlg, 2,0% T80, 5.000 rpm de agitação por 2 min e gotejada a 15 cm de distância sob solução salina contendo 2,0%  $\text{CaCl}_2$  em um tempo de maturação de 15,5 min. A eficiência de encapsulação foi de 96,6%, sendo muito superior a outras metodologias e quando outros compostos bioativos foram usados com hidroesferização com alginato de sódio relatados em literatura. Caso se deseje comercializar as microcápsulas secas, estas devem ser desidratadas evitando temperaturas elevadas, embora o sistema as proteja da perda de OE. Há interação entre os componentes de produção de microcápsulas, pois sua termoestabilidade não é previsível com a propriedade dos componentes individuais. A melhor condição de secagem, verificada pela superfície mais íntegra por microimagem de MEV, foi a de 25°C/24h. A desidratação realizada por liofilização, além de aumentar os custos operacionais energéticos, produz microcápsulas com poros superficiais que podem contribuir para a perda de OE.

Testes de liberação gastrointestinal *in vitro* revelaram que o meio intestinal apresenta melhores condições de disponibilizar o OE, podendo atingir 79% para 4h, sendo que o TA é reconhecidamente melhor absorvido nesta porção.

De modo geral, os dados obtidos até o momento permitem supor a viabilidade da aplicação terapêutica do trans-anetol via oral por microcápsulas desidratadas nas condições otimizadas de hidrodestilação, emulsificação, microencapsulação e secagem. Isto permitiria, portanto, dar prosseguimento mais detalhado aos estudos quanto ao uso de trans-anetol no tratamento de mal de Alzheimer (em função da inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase) e mesmo quanto aos efeitos anticarcinogênicos em função da administração de trans-anetol nas células intestinais, citados por Bhadra et al. (2011) e Asif et al. (2016), respectivamente. Tal administração possivelmente ocorreria pela ingestão de microcápsulas desidratadas comercializadas na forma de sachês.



## 6 SUGESTÕES FUTURAS

As microcápsulas contendo óleo essencial de anis-estrelado devem ser testadas quanto à sua liberação de composto bioativo também em meios simulados contendo enzimas, assim como teste passando as mesmas microcápsulas em meio gástrico e intestinal, consecutivamente.

Sugere-se também testes *in vitro* para aplicação em tratamento do mal de Alzheimer, através de ensaios que avaliem o grau de inativação de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, e testes *in vitro* para verificar efeitos anticarcinogênicos em células intestinais.

Na sequência, seria indicado realizar testes de absorção *in vivo* utilizando-se roedores e também verificar se a melhor maneira de comercialização das microcápsulas desidratadas seria via sachês, por exemplo.

## REFERÊNCIAS

ABANG, S.; CHAN, E.-S.; PONCELET, D. Effects of process variables on the encapsulation of oil in ca-alginate capsules using an inverse gelation technique. **Journal of Microencapsulation**, v. 29, n. 5, p. 417–428, 2012.

AL-MANSOUB, M. A.; ASMAWI, M. Z.; MURUGAIYAH, V. Effect of extraction solvents and plant parts used on the antihyperlipidemic and antioxidant effects of *Garcinia atroviridis*: A comparative study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 8, p. 1552–1558, 2014.

ALI, B. et al. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 589–598, 2015.

ALIHEIDARI, N. et al. Comparative evaluation on fatty acid and *Matricaria recutita* essential oil incorporated into casein-based film. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, p. 69–75, 2013.

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 5ª Edição. Vol. 2. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

AOAC, A. O. O. A. C. **Official methods of analysis of AOAC international (AOAC)**. 2v. 17h ed ed. Gaithersburg: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, INC., 2000.

ARNAO, M., CANO, A., & ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 239–244, 2001.

ASBAHANI, A. EL et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220–243, 2015.

ASIF, M. et al. Anticancer attributes of *Illicium verum* essential oils against colon cancer. **South African Journal of Botany**, v. 103, p. 156–161, 2016.

BAIL, S. et al. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1122–1132, 2008.

BASAK, S.; GUHA, P. Betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil microemulsion:

Characterization and antifungal activity on growth , and apparent lag time of *Aspergillus flavus* in tomato paste. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 616–623, 2017.

BEHRING, J. L. et al. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: Um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 492–495, 2004.

BENZIE, I. .; STRAIN, J. . The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–6, 1996.

BHADRA, S. et al. Anticholinesterase activity of standardized extract of *Illicium verum* Hook. f. fruits. **Fitoterapia**, v. 82, n. 3, p. 342–346, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

CAI, M. et al. Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of star anise oil from *Illicium verum* Hook.f. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 11, p. 2324–2330, 2013.

CAI, M. et al. Optimization and comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted extraction of shikimic acid from Chinese star anise. **Separation and Purification Technology**, v. 133, p. 375–379, 2014.

CALVO, T. R. A.; BUSCH, V. M.; SANTAGAPITA, P. R. Stability and release of an encapsulated solvent-free lycopene extract in alginate-based beads. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 406–412, 2017.

CAVALCANTI, R. N. et al. Supercritical fluid extraction with a modifier of antioxidant compounds from jabuticaba ( *Myrciaria cauliflora* ) by- products : economic viability. **Italian Oral Surgery**, v. 1, p. 1672–1678, 2011.

CAVALLIERI, Â. L. F. **Gelificação a frio de proteínas do soro do leite: efeito da taxa de acidificação, pH final e adição de polissacarídeos**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2007.

CENDON, F. V. **Modelagem e simulação da liberação de insulina encapsulada**

**em partículas de alginato e.** [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2014.

CENDON, F. V. et al. Effect of matrix composition, sphere size and hormone concentration on diffusion coefficient of insulin for controlled gastrointestinal delivery for diabetes treatment. **Journal of Microencapsulation**, v. 35, n. 1, p. 13–25, 2018.

CHEMPAKAM, B.; BALAJI, S. Star Anise. In: PARTHASARATHY, V. A.; CHEMPAKAM, B.; ZACHARIA, T. J. (Eds.). **Chemistry of Spices**. [s.l.] CAB International, 2008. p. 319–330.

CHOUKSEY, D., SHARMA, P., PAWAR, R. S. Biological activities and chemical constituents of *Illicium verum* hook fruits (Chinese star anise). **Der Pharmacia Sinica**, p. 1–10, 2010.

CHOUKSEY, D.; UPMANYU, N.; PAWAR, R. S. Central nervous system activity of *Illicium verum* fruit extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 11, p. 869–875, 2013.

CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. **Advances in Polymer Science**, v. 83, p. 57–192, 1987.

CNSEED.ORG. **Star Anise seed - *Illicium verum***. Disponível em: <<https://www.cnseed.org/star-anise-seed-illicium-verum.html>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

COLUSSO, A. S. **Produção e caracterização de nanocápsulas contendo trans - anetol e avaliação in vitro da capacidade antioxidante**. [s.l.] Centro Universitário Franciscano, 2016.

COOK, W. B.; HOWARD, A. S. The essential oil of *Illicium anisatum* Linn. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 44, p. 2461–2465, 1966.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. R. **Fennema's food chemistry**. 4th. ed. [s.l.] CRC Press/Taylor & Francis, 2008.

DE SOUZA JUNIOR, W. C. **Imobilização de células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de galactoligossacarídeos**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2006.

DELADINO, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 126–134, 2008.

DESTRO, B. G. I.; JORGE, R. M. M.; MATHIAS, A. L. Optimization of High-Concentration Trans-Anethole Production through Hydrodistillation of Star Anise. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, 2019.

DIAS, S. V. E. **Formação, caracterização e estabilidade de emulsões múltiplas A1/O/A2 com óleo de abacate**. [s.l.] Federal University of Paraná, 2016.

DO COUTO, M. I. P. B. **Avaliação estrutural e reológica de emulsões preparadas com óleo de *Dipterix alata* Vog. (Baru), preparadas com óleo de *dipterix alata* Vog. (Baru), estabilizadas com goma arábica e quitosana**. [s.l.] Federal University of Goiás, 2014.

DONG, Z. et al. Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews. **Food Chemistry**, v. 149, p. 54–61, 2014.

DU NOUY, P. L. A new apparatus for measuring surface tension. **The Journal of General Physiology**, v. 1, n. 5, p. 521–524, 1919.

DZAMIC, A. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 2, p. 259–261, 2009.

ECHA. **European Chemicals Agency**. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/support/substance-identification/sector-specific-support-for-substance-identification/essential-oils>>. Acesso em: 16 out. 2018.

FERNANDES, R. V. DE B. et al. Study of ultrasound-assisted emulsions on microencapsulation of ginger essential oil by spray drying. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 413–423, 2016.

FERNANDES, R. V. DE B. et al. Proposing Novel Encapsulating Matrices for Spray-Dried Ginger Essential Oil from the Whey Protein Isolate-Inulin/Maltodextrin Blends. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, p. 115–130, 2017.

FRITSCH, P.; BLANQUAT, G. DE SAINT; DERACHE, R. Absorption gastro-intestinale, chez le rat, de l'anisole, du trans-anéthole, du butylhydroxyanisole et du

safrole. **Toxicology**, v. 13, p. 359–363, 1975.

GARBER, M.; HERRLINGER, R.; CIESIELSKI, L. F. **Production of anethole from sulfate turpentine residues** USA, 1962.

GHOSH, P. **Surface tension** Department of Chemical Engineering IIT Guwahati Guwahati, India, 2013. Disponível em: <<https://nptel.ac.in/courses/103103033/module2/lecture1.pdf>>

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, p. 267–285, 1998.

GONSALVES, J. K. M. C. et al. Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método de coacervação simples. **Scientia Plena**, v. 5, n. 11, p. 1–8, 2009.

GRAFT, J.; BRINCH, K.; MADSEN, J. L. Gastrointestinal mean transit times in young and middle-aged healthy subjects. **Clinical Physiology**, v. 21, n. 2, p. 253–259, 2001.

GUPTA, P. K.; JADHAV, S. B.; SINGHAL, R. S. Development of shrikhand premix using microencapsulated rice bran oil as fat alternative and hydrocolloids as texture modifier. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 220–227, 2015.

HASHTJIN, A. M.; ABBASI, S. Optimization of ultrasonic emulsification conditions for the production of orange peel essential oil nanoemulsions. **J Food Sci Technol**, v. 52, n. May, p. 2679–2689, 2015.

HASSEINEA, A.; MENAIB, A. H.; KORICHIC, M. Salting-out effect of single salts NaCl and KCl on the LLE of the systems (water + toluene + acetone), (water + cyclohexane + 2-propanol) and (water + xylene + methanol). **Desalination**, v. 242, n. 1–3, p. 264–276, 2009.

HERRERA, K. C. Intoxicación por anís de estrella. **Acta Pediátrica Costarricense**, v. 21, n. 1, p. 60–61, 2009.

HORST, B. L. **Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana e quitosana/alginato através das técnicas de impregnação, coacervação e spray drying**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.



HOWES, M.-J. R.; KITE, G. C.; SIMMONDS, M. S. J. Distinguishing Chinese star anise from Japanese star anise using thermal desorption - Gas chromatography - Mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 13, p. 5783–5789, 2009.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841–1856, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4<sup>a</sup> ed. (1<sup>a</sup> Edição digital), 2008. 1020 p. Disponível em: <[http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf)>. Acesso em: fevereiro de 2017.

IZE-LUDLOW, D. et al. Chemical Composition of Chinese Star Anise (*Illicium verum*) and Neurotoxicity in Infants. **The Journal of the American Medical Association**, v. 291, n. 5, p. 562–563, 2004.

JAE-YEON, L. **Preservative and insecticide composition using illicium verum Hook.** fCoréia do Sul, 2011.

JOKIC, S. et al. Modelling of the process of solid–liquid extraction of total polyphenols from soybeans. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 28, p. 206–212, 2010.

KAIMAINEN, M. et al. Encapsulation of betalain into w/o/w double emulsion and release during invitro intestinal lipid digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 899–904, 2015.

KARAMUSTAFA, F.; ÇELEBI, N. Development of an oral microemulsion formulation of alendronate: Effects of oil and co-surfactant type on phase behaviour. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 5, p. 315–323, 2008.

KFOURY, M. et al. Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: Chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. **Food Chemistry**, v. 164, p. 454–461, 2014.

KING, A. H. Flavor encapsulation with alginates. In: RISH, S. J.; REINECCIUS, G. A. (Ed.). **Flavor Encapsulation**. Washington: DC: ACS, 1988. p. 122–125.

KOÇ, B.; EREN, İ.; ERTEKIN, F. K. Modelling bulk density, porosity and shrinkage of quince during drying: The effect of drying method. **Journal of Food Engineering**, v.

85, n. 3, p. 340–349, 2008.

KOMAIKO, J.; SASTROSUBROTO, A.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of Oil-in-Water Emulsions from Natural Emulsifiers Using Spontaneous Emulsification: Sunflower Phospholipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 10078–10088, 2015.

KOO, S. Y. et al. Microencapsulation of peppermint oil in an alginate-pectin matrix using a coaxial electrospray system. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 733–739, 2014.

KOZLOWSKA, M. et al. Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds. **Food Chemistry**, v. 213, p. 450–456, 2016.

KROKIDA, M. K.; MAROULIS, Z. B. Effect of drying method on shrinkage and porosity. **Drying Technology**, v. 15, n. 10, p. 2441–2458, 1997.

KYOWA. **Fundamental of surface tension**. Disponível em: <<https://www.slideshare.net/scientificgear/fundamental-of-surface-tension>>. Acesso em: 25 out. 2018.

LAMBSHOPPE. **Star anise**. Disponível em: <<http://lambshoppe.com/wp-content/uploads/2013/03/135705290.jpg%0A>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

LEICK, S. et al. Deformation of liquid-filled calcium alginate capsules in a spinning drop apparatus. **Phys Chem Chem Phys**, v. 28, n. 12, p. 2950–8, 2010.

LERTSUTTHIWONG, P. et al. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 2, p. 209–214, 2008.

LI, G. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> oil extraction from Chinese star anise seed and simultaneous compositional analysis using HPLC by fluorescence detection and online atmospheric CI-MS identification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 11, p. 1905–1913, 2010.

LI, Y. et al. From Laboratory to Industry: Scale-Up, Quality, and Safety Consideration for Microwave-Assisted Extraction. In: **Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds. Food Engineering Series**. Boston, MA: Springer, 2012.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (Caryocar brasiliense, Camb.)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.

LIMA, R. K. et al. Composição dos óleos essenciais de anis-estrelado *Illicium verum* L. e de capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: Avaliação do Efeito Repelente sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). **BioAssay**, v. 3, n. 8, p. 1–6, 2008.

LIU, K.; XU, Y.; WANG, X. Microencapsulation of sweet orange oil terpeneless using the orifice method. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 3, p. 390–394, 2012.

LIU, R. H. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, v. 46, p. 207–219, 2007.

LU, W. C. et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, p. 1–8, 2016.

LUPO, B. et al. Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 56–65, 2014.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 2002, 2002.

MARQUES, B. C. **Cinética de hidratação de grãos de milho transgênico e convencional e estudo de suas propriedades físico-químicas e tecnológicas**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2014.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade Nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285–330, 2011.

MULLER, P. S. **Microencapsulação do óleo essencial de laranja**. [s.l.] Federal University of Paraná, 2011.

NAKAMURA, T.; OKUYAMA, E.; YAMAZAKI, M. Neurotropic components from Star anise (*Illicium verum* Hooke. fil.). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n.

10, p. 1908–1914, 1996.

NAVARRO, R. et al. Effect of type of encapsulating agent on physical properties of edible films based on alginate and thyme oil. **Food and Bioproducts Processing**, v. 97, p. 63–75, 2016.

NINO. **How to choose surface tensiometer or tensiometry**. Disponível em: <[http://www.surface-tension.org/surface tension meter/surface tension meter.htm](http://www.surface-tension.org/surface%20tension%20meter/surface%20tension%20meter.htm)>. Acesso em: 25 out. 2018.

NOIPA, T. et al. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. **Food Research International**, v. 44, p. 798–806, 2011.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.

OLIVEIRA, J. L. et al. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 8, p. 1550–61, dez. 2014.

OLIVEIRA, T. L. DE C.; SOARES, R. D. A.; PICCOLI, R. H. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella Enteritidis* in ground beef during refrigerated storage. **Meat science**, v. 93, n. 3, p. 645–51, mar. 2013.

OLIVEIRA, A. C. DE et al. Quim. Nova, **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OTÁLORA, M. C. et al. Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. **Food chemistry**, v. 187, p. 174–81, 15 nov. 2015.

OTÁLORA, M. C. et al. Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. **Food Chemistry**, v. 202, p. 373–382, 2016.

PADMASHREE, A. et al. Star-anise (*Illicium verum*) and black caraway (*Carum*

nigrum) as natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 59–66, 2007.

PANNALA, A. S. et al. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1161–1168, 2001.

PARRY, J. et al. Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 566–573, 2005.

PAULA, A. et al. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry ( *Rubus fruticosus* L .) residues : a comparison with conventional methods. **FRIN**, v. 77, p. 675–683, 2015.

PENG, W. et al. Molecular characteristics of *Illicium verum* extractives to activate acquired immune response. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 3, p. 348–352, 2016.

PENG, Y.; LI, Y. Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. **Food hydrocolloids**, v. 36, p. 287–293, 2014.

PENICHE, C. et al. Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 5, p. 865–871, 2004.

PEREIRA, M. C. et al. Nanoencapsulation of hydrophobic phytochemicals using poly (dl-lactide-co-glycolide) (PLGA) for antioxidant and antimicrobial delivery applications: Guabiroba fruit (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) study. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 100–107, set. 2015.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005.

PUBCHEM. **Anethole**. Disponível em:  
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/trans-Anethole#section=Environmental-Fate>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay.

**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396–3402, 2000.

QUIDEAU, S. et al. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Natural Products**, v. 50, p. 586–621, 2011.

RAJABI, H. et al. Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. **Food hydrocolloids**, v. 51, p. 327–337, 2015.

RAO, M. A. **Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications**. 2nd ed ed. New York: Springer, 2007.

RAVICHANDRAN, K. et al. Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. September, p. 2216–2221, 2014.

RE, R. et al. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231–1237, 1999.

RUFINO, M. DO S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado Técnico**, v. 125, p. 1–4, 2006.

RUFINO, M. DO S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SANTOS, A. P.; PANAGIOTOPOULOS, A. Z. Determination of the critical micelle concentration in simulations of surfactant systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 144, n. 4, p. 044709.1-9, 2016.

SANTOS, D. N. et al. Arginase inhibition, antibacterial and antioxidant activities of Pitanga seed ( *Eugenia uniflora* L .) extracts from sustainable technologies of high pressure extraction. **Food Bioscience**, v. 12, p. 93–99, 2015.

SANTOS, F. K. et al. **Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo** Campinas, SP4o PDPETRO, , 2007.

SCOPEL, R. et al. Fluid phase equilibria and mass transfer studies applied to



supercritical fluid extraction of *Illicium verum* volatile oil. **Fluid Phase Equilibria**, v. 417, p. 203–211, 2016.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, p. 1–25, mar. 2015.

SHREVE, B.; THIEX, N.; WOLF, M. **NFTA Method 2.1.4 - Dry Matter by Oven Drying for 3 hr at 105°C**. Disponível em: <<http://www.foragetesting.org/files/NFTAReferenceMethodDM-09-18-06.pdf>>. Acesso em: 15 maio. 2017.

SIGMA-ALDRICH. **(R)-(+)-Limonene**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/183164?lang=pt&region=BR>>. Acesso em: 23 maio. 2019a.

SIGMA-ALDRICH. **Estragol**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/estragole1482014067011?lang=pt&region=BR>>. Acesso em: 23 maio. 2019b.

SILVA, E. K.; MEIRELES, M. A. A. Influence of the degree of inulin polymerization on the ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 578–586, 2015.

SINGH, G. et al. Chemical constituents, antimicrobial investigations and antioxidative potential of volatile oil and acetone extract of star anise fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 1, p. 111–121, 2006.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. . J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. 2ª Edição ed. East Lansing, Michigan State, EUA: Freeman Press, 1996.

STIPPLER, E.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Comparison of US Pharmacopeia Simulated Intestinal Fluid TS (without pancreatin) TS of the International Pharmacopoeia with Respect to Their Use in vitro Dissolution Testing. **Dissolution**

**Technologies**, n. May, p. 6–10, 2004.

SUNG, Y. Y.; KIM, H. K. Illicium verum extract suppresses IFN- $\gamma$ -induced ICAM-1 expression via blockade of JAK/STAT pathway in HaCaT human keratinocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 626–632, 2013.

SUNG, Y. Y.; KIM, Y. S.; KIM, H. K. Illicium verum extract inhibits TNF- $\alpha$ - and IFN- $\gamma$ -induced expression of chemokines and cytokines in human keratinocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 182–189, 2012.

TAGHVAEI, M. et al. The effect of natural antioxidants extracted from plant and animal resources on the oxidative stability of soybean oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 124–130, 2014.

TAN, L. H.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Alginate/starch composites as wall material to achieve microencapsulation with high oil loading. **Journal of microencapsulation**, v. 26, n. 3, p. 263–271, 2009.

TAPIA, M. S.; ALZAMORA, S. M.; CHIRIFE, J. **Effects of Water Activity (aw) on Microbial Stability: As a Hurdle in Food Preservation, in Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications** (eds G. V. Barbosa-Cánovas, A. J. Fontana, S. J. Schmidt and T. P. Labuza). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2007.

THOSAR, N. et al. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An in vitro study. **European Journal of Dentistry**, v. 7, n. 5 SUPPL., 2013.

TUAN, D. Q.; ILANGANTILEKET, S. G. Liquid CO<sub>2</sub> extraction of essential oil from Star anise fruits (*Illicium verum* H.). **Journal of Food Engineering**, v. 31, n. 1, p. 47–57, 1997.

VILLAR, A. M. S. et al. Design and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery systems ( SNEDDS ) for enhanced dissolution of gemfibrozil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 431, n. 1–2, p. 161–175, 2012.

WANG, G. W. et al. *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 10–20, 2011.

WANG, J.; WANG, Y.; LONG, C. Preparation of aniseed oleoresin microcapsules. **Journal of The Chinese Cereals and Oils Association**, 2008.

WANG, L. et al. Microencapsulation of Ginger Volatile Oil Based on Gelatin / Sodium Alginate Polyelectrolyte Complex. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 64, n. 1, p. 21–26, 2016.

WANG, Q. et al. Optimization and evaluation of microencapsulation of star anise oleoresin. **Journal of Processing and Preservation**, v. 38, p. 2129–2136, 2014.

WANG, Q.; JIANG, L.; WEN, Q. Effect of three extraction methods on the volatile component of *Illicium verum* Hook. f. analyzed by GC-MS. **Wuhan University Journal of Natural Sciences**, v. 12, n. 2, p. 529–534, 2007.

WANG, Y. et al. Studies on bioactivities of tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel extracts : Antioxidant activity and inhibitory potential against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase in vitro. **Industrial Crops & Products**, v. 37, n. 1, p. 520–526, 2012.

WHO. **Quality control methods for herbal materials** World Health Organization, 2011.

WHO/IPCS\_INCHEM. **Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - Trans-anethole**. Disponível em: <[http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec\\_137.htm](http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_137.htm)>. Acesso em: 22 out. 2018.

WILSON, C. G.; CROWLEY, P. J. **Controlled Release in Oral Drug Delivery**. Nova Iorque: Springer, 2011.

WONG, Y. C.; LEE, P. P.; NURDIYANA, W. A. W. Extraction and antioxidative activity of essential oil from star anise (*Illicium verum*). **Oriental Journal of Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 1159–1171, 2014.

WU, L. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. **Food Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 319–327, mar. 2006.

YAGHMUR, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. Phase behavior of microemulsions based on food-grade nonionic surfactants: Effect of polyols and short-chain alcohols. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 209, n. 1, p. 71–81, 2002.

YAN, M. et al. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 1, p. 89–97, 2014.

ZHAI, Y. et al. Microwave extraction of essential oils from dried fruits of *Illicium verum* Hook. f. and *Cuminum cyminum* L. using ionic liquid as the microwave absorption medium. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 20, p. 3544–3549, 2009.

ZHANG, S. et al. Microencapsulation of tea tree oil by spray-drying with methyl cellulose as the emulsifier and wall material together with chitosan/alginate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 13, p. 1–10, 2017.

ZHU, L. et al. In vitro ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1–2, p. 112–117, 2013.

ZUGE, L. C. B. **Extração e caracterização da polpa e do óleo de abacate**. [s.l.] Federal University of Paraná, 2015.

ZÜGE, L. C. B. et al. Catastrophic inversion and rheological behavior in soy lecithin and Tween 80 based food emulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 72–77, 2013.

## ANEXO A

## Equipamentos utilizados e respectivos laboratórios aos quais pertencem

EQUIPAMENTO	MODELO/ MARCA	LABORATÓRIO	PRÉDIO (CAMPUS POLITÉCNICO – UFPR)
Agitador magnético	752A (FISATOM®)	Laboratório de Emulsões (Emultec)	Usina Piloto B
Análises de capacidade antioxidante	-	Laboratório de Análises em Compostos Bioativos	Usina Piloto A
Análise termogravimétrica	TGA 4000 (PERKIN ELMER®)	Central Analítica	Usina Piloto A
Banho termostático para viscosímetro	Tecnal T-184 (Tecnal®)	Laboratório de Emulsões (Emultec)	Usina Piloto B
Banho ultrassônico	SoniClean 6 (SANDERS MEDICAL®)	Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS)	Usina Piloto B
Centrífuga de microtubos	Centrifuge Heraeus Fresco 21 (THERMO SCIENTIFIC®)	Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS)	Usina Piloto B
Clevenger (aparelho de hidrodestilação)	-	Laboratório de Inovação e Otimização de Produto e Processo (LIOPP)	Usina Piloto B
Cromatógrafo a gás acoplado a espectro de massas	GC-MS; (SHIMADZU®)	Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ)	Química
Cromatógrafo a gás acoplado a espectro de massas	GC-MS; GC-2010 Plus (SHIMADZU®)	Grupo de Cromatografia e às Técnicas de Microextração (CroMe)	Química
Equipamento Karl Fischer	V30 Compact Volumetric KF Titrator (METTLER TOLEDO®)	Central Analítica	Usina Piloto A
Equipamento para secagem infravermelho	System BG-200 (GEHAKA®)	Laboratório de Análise de Alimentos	Usina Piloto B

Equipamento para determinar atividade de água	Aqualab Pre (DECAGON®)	Laboratório de Análise de Alimentos	Usina Piloto B
Espectrômetro de varredura UV-Vis	UV-1800 (SHIMADZU®)	Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS)	Usina Piloto B
Espectrofotômetro para leitura de microplacas	<i>Multi-Detection Microplate Reader Synergy HT</i> (BIOTEK®)	Laboratório de Farmacologia e Fisiopatologia da Pele (LAFFPEL)	Farmacologia
Estufa	QUIMIS®	Laboratório de Química Analítica Aplicada	Usina Piloto A
Estufa de Cultura Bacteriológica	Q316m (QUIMIS®)	Laboratório de Inovação e Otimização de Produto e Processo (LIOPP)	Usina Piloto B
Extrator Soxhlet	-	Laboratório de Química Analítica Aplicada	Usina Piloto A
Homogeneizador	Polytron PT 3100 D (KINEMATICA AG®)	Laboratório de Emulsões (Emultec)	Usina Piloto B
Incubadora Refrigerada com Agitação	TE-42I (TECNAL®)	Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS)	Usina Piloto B
Manta de aquecimento	QUIMIS®	Laboratório de Inovação e Otimização de Produto e Processo (LIOPP)	Usina Piloto B
Microscópio eletrônico de varredura	MonoCL4 (GATAN®)	Centro de Microscopia Eletrônica (CME)	Centro de Microscopia Eletrônica (CME)
Microscópio invertido	Zeiss Observer D1 (ZEISS VISION GMBH®)	Laboratório de Emulsões (Emultec)	Usina Piloto B
Liofilizador	L101 (LIOTOP®)	Laboratório de Emulsões (Emultec)	Usina Piloto B
Liquidificador doméstico	Clic'Lav, ARNO®	Laboratório de Inovação e Otimização de Produto e Processo (LIOPP)	Usina Piloto B
Peneiras granulométricas com sistema de vibração	BERTEL®	Laboratório de Química Analítica Aplicada	Usina Piloto A

Refratômetro Abbe	BIOBRIX®	Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA)	Usina Piloto A
Tensiômetro	K100 <i>Tensiometer</i> , (KRUS <sup>®</sup> )	Laboratório de Emulsões (Emultec)	Usina Piloto B
Viscosímetro	Brookfield, modelo DV- II+Pro (Brookfield Engineering Laboratories <sup>®</sup> )	Laboratório de Emulsões (Emultec)	Usina Piloto B



## **ANEXO B**

### **Preparo das soluções utilizadas nos ensaios de compostos fenólicos totais, ABTS, DPPH e FRAP.**

#### **1. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS**

- Reagente Folin-Ciocalteu filtrado.
- Solução saturada de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 20% (m/v) em balão volumétrico.
- Reações

Para as reações, foi obedecida a seguinte sequência de adição de reagentes: água destilada, amostra, reagente de Folin-Ciocalteu, com posterior homogeneização e aguardou-se 3 min. Em seguida, foi adicionado  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , homogeneizado e deixado em repouso por 60 min a temperatura ambiente, realizando a leitura a 720 nm.

#### **2. ENSAIO DE SEQUESTRO DOS RADICAIS LIVRES POR 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILA (DPPH)**

- Solução-mãe de DPPH 0,06 mmol/L em álcool metílico:

Foram pesados 0,0024 g de DPPH em balão volumétrico âmbar de 100 mL, avolumando-se com álcool metílico.

- Curva padrão:

Os pontos da curva-padrão foram realizados nas concentrações de 0 a 1 mmol/mL, em álcool metílico, em tubos de 10 mL. As leituras foram realizadas a 515 nm.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 515 nm.

### **3. ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER - FRAP)**

- Solução tampão acetato de sódio 300 mM (pH 3,63):

Foram pesados 1,87 g de acetato de sódio anidro e adicionados 16 mL de ácido acético glacial. A solução foi avolumada com água destilada em balão volumétrico de 1 L.

- Solução de ácido clorídrico (HCl):

3,31 mL de HCl P.A. foi adicionado a balão volumétrico de 1 L contendo água destilada e avolumado.

- Solução de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) 20 mM:

Foram pesados 0,135 g de  $\text{FeCl}_3$  em balão volumétrico de 25 mL e posteriormente avolumados com água destilada.

- Solução de 2,4,6-tripidil-s-tri-azina (TPTZ) 10 Mm:

Foram pesados 0,03212 g de TPTZ em balão volumétrico de 10 mL e posteriormente avolumados com HCl P.A.

- Padrão de Trolox: a solução-mãe de concentração 1,0 mmol (1000  $\mu\text{mol/L}$ ) foi preparada e utilizada no mesmo dia da análise.

- Curva padrão:

Os pontos da curva-padrão foram realizados nas concentrações de 0 a 1 mmol, em água destilada, em tubos de 10 mL. As leituras foram realizadas a 593 nm.

- Solução FRAP:

A solução FRAP foi preparada adicionando-se 100 mL de tampão acetato de sódio, 10 mL de solução  $\text{FeCl}_3$  e 10 mL de solução TPTZ em HCl, exatamente nesta ordem.

- Reações

O conjunto foi deixado em repouso no escuro durante 30 min e as leituras foram realizadas a 593 nm, em equipamento previamente zerado com solução FRAP.

#### 4. MÉTODO DO RADICAL ABTS

- Solução estoque de ABTS 7 mM:

Foram dissolvidos 192 mg do reagente ABTS em água destilada, avolumando-se para 50 mL e acondicionado em frasco âmbar. A solução foi armazenada sob refrigeração, tendo validade por um mês.

- Solução de persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) 140 mM:

Foram dissolvidos 378,4 mg de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  em água destilada e avolumou-se para 10 mL. A solução foi homogeneizada, transferida para frasco de vidro âmbar e armazenada por até um mês em temperatura ambiente.

- Preparo do radical ABTS:

O radical ABTS foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ . A solução foi mantida em ambiente escuro por 16 h. Ao término do repouso, no dia de análise, 1 mL desta solução foi diluída em álcool etílico até absorbância final de  $0,700 \pm 0,05$  nm a 734 nm.

- Padrão de Trolox: a solução-mãe de concentração 1,0 mmol (1000  $\mu\text{mol/L}$ ) foi preparada e utilizada no mesmo dia da análise.

- Curva padrão:

Os pontos da curva-padrão foram realizados nas concentrações de 0 a 1 mmol, em álcool etílico, em tubos de 10 mL. As leituras foram realizadas a 734 nm.

- Reação:

Após adição dos reagentes nas devidas proporções, aguardou-se repouso de 6 min em ambiente escuro e a absorbância foi medida a 734 nm, em equipamento zerado com álcool etílico.

## ANEXO C – COMPROVANTES DE ACEITE E SUBMISSÃO DE ARTIGOS

### 1º ARTIGO

O artigo “Optimization of High-Concentration Trans-Anethole Production through Hydrodistillation of Star Anise”, contendo os dados de otimização de moagem e de otimização da hidrodestilação, foi aceito no periódico *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, com classificação A2 para Ciência de Alimentos, conforme Plataforma Sucupira (2018).

18/09/2018

ScholarOne Manuscripts

### Brazilian Journal of Chemical Engineering

#### Decision Letter (BJCE-2018-0203.R1)

**From:** savio@feq.unicamp.br

**To:** barbara.iarema@gmail.com, bgidestro@gmail.com

**CC:**

**Subject:** Brazilian Journal of Chemical Engineering - Decision on Manuscript ID BJCE-2018-0203.R1

**Body:** 18-Sep-2018

Dear Mrs. Destro:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Optimization of High-Concentration Trans-Anethole Production through Hydrodistillation of Star Anise" in its current form for publication in the Brazilian Journal of Chemical Engineering. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

We are starting the next steps for publication, the English proofreading and the preparation of the galley proofs (please note that these steps may take some additional time because there is a line of accepted articles being processed on a first-come-first-served basis). Please wait for a future contact from the Editor-in-Chief or from our publication office to verify the outcome of these steps.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Brazilian Journal of Chemical Engineering, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Sávio Vianna

Associate Editor, Brazilian Journal of Chemical Engineering

## Original Article

# Optimization of High-Concentration Trans-Anethole Production through Hydrodistillation of Star Anise

Bárbara Gomes Iarema Destro<sup>1</sup>, Regina Maria Matos Jorge<sup>1</sup>, Alvaro Luiz Mathias<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Department of Chemical Engineering, Graduate Program in Food Engineering, Federal University of Paraná, Av. Francisco Hoffman dos Santos, s.n., Curitiba, PR, CEP 81530-900, Brazil.

\*Corresponding author. E-mail address: mathias@ufpr.br

## Optimization of High-Concentration Trans-Anethole Production through Hydrodistillation of Star Anise

*Illicium verum* Hook essential oil (EO) is composed mainly of trans-anethole (TA), which has therapeutic potential. The extraction is usually by hydrodistillation, taking long hours, leaving the process costly and product with lower quality. Thus, the present study sought to optimize dehydrated fruit fragmentation by Box-Wilson central composite design and EO extraction and EO quality using a  $2^{4-1}$  fractional factorial design. It is concluded that the fruits must be fragmented to sizes smaller than 425  $\mu\text{m}$  using a knife mill. For hydrodistillation, the condition reported as ideal was granulometry < 0.425 mm, 8% mass, 1 hour and water volume of 200 mL. This process provided EO yield of 10.2% and high-grade TA (96.6%), requiring shorter time of extraction.

Keywords: antioxidant; essential oil; hydrodistillation; *Illicium*.



## 2º ARTIGO

O artigo “Antioxidant Capacity of Star Anise Essential Oil Extracted by Hydrodistillation”; contendo os dados de antioxidantes para as amostras obtidas na otimização da hidrodestilação, foi submetido na data de 21 de fevereiro de 2019 ao periódico *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, com classificação A2 para Ciência de Alimentos, conforme Plataforma Sucupira (2018).

# Submission Confirmation

 Print

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Brazilian Journal of Chemical Engineering

**Manuscript ID**

BJCE-2019-0099

**Title**

Antioxidant Capacity of Star Anise Essential Oil Extracted by Hydrodistillation

**Authors**

Destro, Bárbara

Jorge, Regina

Mathias, Alvaro

**Date Submitted**

21-Feb-2019

## Antioxidant capacity of star anise essential oil extracted by hydrodistillation

The Chinese star anise essential oil is sought for its pleasant aroma and its health-promoting properties as an antioxidant. The objective of this study was twofold – to evaluate the effect of hydrodistillation conditions on its antioxidant capacity, and to perform a comparative evaluation of total phenolic compounds, ABTS, FRAP and DPPH. Antioxidant potential is dependent on extraction conditions, and the best antioxidant performance was obtained for 3 hours of hydrodistillation time, using 500 mL distilled water with 8% dry fruits whose granulometry was inferior to 425  $\mu\text{m}$ . The methodologies used for assessing antioxidant capacity are precise, but cannot accurately describe the antioxidant capacity because they cannot be correlated; they must therefore be used simultaneously. The antioxidant potential was  $59.6 \pm 1.1$  mg GAE/g EO for TP;  $14.3 \pm 0.5$  mmol TEAC/g EO for FRAP;  $25.7 \pm 0.8$  mmol TEAC/g EO for ABTS and  $23.5 \pm 0.3$  mmol TEAC/g EO for DPPH. The oil exhibited better antioxidant capacity than the trans-anethole and D-limonene standards, suggesting a positive synergistic effect. The DPPH method exhibited a good coefficient of determination ( $R^2 = 0.9311$ ), and has the advantage of using a solvent compatible with the essential oil.

Keywords: Antioxidant capacity; DPPH; essential oil; hydrodistillation; *Illicium verum* Hook; total phenolics.

### 3º ARTIGO

O artigo “Stability and microencapsulation of the star anise essential oil emulsion”; contendo os dados de estabilidade de emulsão e os testes iniciais de microencapsulação foi submetido na data de 02 de junho de 2019 ao periódico *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, com classificação A2 para Ciência de Alimentos, conforme Plataforma Sucupira (2018).

## Submission Confirmation

[Print](#)

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Brazilian Journal of Chemical Engineering

**Manuscript ID**

BJCE-2019-0271

**Title**

Stability and microencapsulation of the star anise essential oil emulsion

**Authors**

Destro, Bárbara

Jorge, Regina

Mathias, Alvaro

**Date Submitted**

02-Jun-2019

## Stability and microencapsulation of the star anise essential oil emulsion

Chinese star anise essential oil (EO) has been described possessing therapeutic properties and an ability to strengthen the immune system, as well as to fight both neurodegenerative diseases and cancer. However, the essential oil must sometimes undergo an emulsification process in order to exploit these properties. In view of this, a  $2^{5-2}$  fractional factorial experimental design was used in order to evaluate the effects of various concentrations of the EO (1-10%), sodium alginate (NaAlg, 0-2.5%) and emulsifier Tween 80 (T80, 1-2%), various homogenization speeds (R, 5,000-15,000 rpm) and homogenization time (t, 1-2 min), using the creaming index (CI,%) as a response variable. Maximum stability (100% CI) for up to 7 days storage at 25°C was achieved using concentrations of 2.0% EO and 0.4% NaAlg, a minimum of 2% T80, agitation between 4,000-6,000 rpm and an agitation time superior to 1.5 min. However, greater amounts of EO and NaAlg may be added if the emulsion is for immediate use; the experimental conditions E6m (10.0% EO, 2.5% NaAlg, 2.0% T80, 5,000 rpm for 2 min) exhibited excellent spherification and had the advantage of reducing operating costs. The hydrospheres thermally protect the EO, but dehydration must be performed at temperatures below 130°C.

**Keywords:** emulsion; essential oil; hydrodistillation; *Illicium verum*, microcapsules.